

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. J. Boch
Angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. E. Munz

DIE NAIROBI SHEEP DISEASE – EINE SYNOPTISCHE DARSTELLUNG DER ERKRANKUNG SOWIE UNTERSUCHUNGEN ZUM VERHALTEN DES ERREGERS IN VIVO UND IN VITRO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereiches Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Ulrike Munderloh
aus Schwaig

München 1977
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555625_0038

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. J. Boch
Angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. E. Munz

DIE NAIROBI SHEEP DISEASE – EINE SYNOPTISCHE DARSTELLUNG DER ERKRANKUNG SOWIE UNTERSUCHUNGEN ZUM VERHALTEN DES ERREGERS IN VIVO UND IN VITRO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereiches Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Ulrike Munderloh
aus Schwaig

München 1977



Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Tiermedizin der Universität

München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus

Referent: Prof. Dr. E. Munz

Korreferent: Prof. Dr. J. von Sandersleben

Tag der Promotion: 29. Juli 1977

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Schrifttum</u>	2
2.1. Begriffsbestimmung	2
2.2. Geschichtliches	2
2.3. Verbreitung und Bedeutung	3
2.4. Erreger	5
2.4.1. Biologische Eigenschaften	5
2.4.1.1. Zellspektrum	5
2.4.1.2. Wirtsspektrum	8
2.4.1.2.1. Das Virus der NSD in seinen Vektoren	9
2.4.1.2.2. NSD-Virusinfektion des Menschen	13
2.4.2. Chemisch-physikalische Eigenschaften	14
2.4.2.1. Nukleinsäuretyp	14
2.4.2.2. Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen und chemisch-physikalischen Faktoren	15
2.4.3. Morphologie	16
2.4.4. Serologische Eigenschaften	17
2.4.5. Klassifizierung des NSD-Virus	20
2.5. Die Krankheit	21
2.5.1. Inkubationszeit	21
2.5.2. Klinische Erscheinungen	22
2.5.3. Veränderungen der Blutwerte	24
2.5.4. Makroskopisch-anatomische Veränderungen	25
2.5.5. Pathologisch-histologische Veränderungen	26
2.5.6. Pathogenese	28
2.5.7. Immunität	29
2.5.8. Prophylaxe und Bekämpfung	29
2.5.9. Diagnose	33
2.5.10. Differentialdiagnosen	34
3. <u>Material und Methoden</u>	36
3.1. Virusstämme	36
3.2. Zellkulturen	36

3.2.1.	Säugetierzellen	36
3.2.1.1.	Subkulturen	36
3.2.1.2.	Zelllinien	37
3.2.2.	Arthropodenzellen	39
3.2.2.1.	Aedes-Zelllinien	39
3.2.2.2.	Rhipicephalus appendiculatus-Zellen	40
3.3.	Versuchstiere	40
3.3.1.	Mäuse	40
3.3.2.	Schafe	41
3.3.3.	Zecken	41
3.4.	Histologische Untersuchungen	42
3.4.1.	Histologische Untersuchungen von Säugetier- organen	42
3.4.2.	Einschlußkörperchenfärbung	42
3.5.	Züchtung des NSD-Virus in Zellkulturen	43
3.5.1.	Züchtung in Hamster- und Schafnierenzellen	43
3.5.2.	Züchtung des NSD-Virus in Zelllinien	43
3.5.2.1.	Züchtung in den Zelllinien BHK 13 und C ₆	43
3.5.2.2.	Züchtung in den Zelllinien 3T6 und Vero	44
3.5.2.3.	Züchtung des NSD-Virus in Arthropodenzellen	44
3.5.2.4.	Titration von Virusmaterial	45
3.5.2.4.1.	Titration in Babymäusen	45
3.6.	Die Infektion von Säugetieren mit NSD-Virus	46
3.6.1.	Infektion von Saugmäusen	46
3.6.2.	Infektion von Schafen mit NSD-Virus	47
3.6.2.1.	Klinisch-chemische Untersuchungen	47
3.6.2.2.	Infektionen mit Originalausgangsmaterial	48
3.6.2.2.1.	Virusstamm 045 MB II BHK 1	48
3.6.2.2.2.	Virusstamm I 105	48
3.6.2.3.	Direkte Schaf-Schaf-Passagen mit dem Virusstamm 045	49
3.6.2.4.	Maus-Schaf-Passagen mit Virusstamm 045	49
3.6.2.5.	Infektionsversuche mit Zecken	50
3.6.2.6.	Versuch der Übertragung von NSD-Virus von infantilen Mäusen auf Zecken	50

4.	<u>Ergebnisse</u>	51
4.1.	Infektionsversuche mit NSD-Virus bei Säugetieren	51
4.1.1.	Die Infektion bei Schafen(Klinik und Sektionsbefunde)	51
4.1.1.1.	Infektion mit Originalausgangsmaterial NSD 045 MB II BHK 1	51
4.1.1.2.	Infektion mit NSD-Virusstamm I 105	52
4.1.1.3.	Schaf-Schaf-Passagen	53
4.1.1.4.	Mäusegehirn-Schaf-Passage	55
4.1.1.5.	Infektionsversuche mit Zecken	56
4.1.1.6.	Verimpfung von Zeckenverreibungen auf Saugmäuse	56
4.1.1.7.	Prüfung der Infizierbarkeit von Zecken an infantilen Mäusen	57
4.1.2.	Verhalten der Werte für Gesamteiweiß, Albumin, α -, β -und γ -Globulin im Serum der Versuchsschafe	57
4.1.3.	Virusgehalt von Organsuspensionen erkrankter Schafe nach Infektion mit dem Virusstamm 045	57
4.2.	NSD-Infektion von Saugmäusen	58
4.2.1.	Klinisches Bild	58
4.2.2.	Vergleich der i.cer. und i.p. Virusapplikation	58
4.3.	Verhalten des NSD-Virus in Zellkulturen	59
4.3.1.	Die Virusvermehrung in Subkulturen	59
4.3.1.1.	Die Infizierung von sekundären Hamsternierenzellkulturen	59
4.3.1.2.	Die Infizierung tertiärer Schafnierenzellkulturen	59
4.3.2.	Die Virusvermehrung in Zelllinien	60
4.3.2.1.	Die Infizierung von BHK 13-Zellen	60
4.3.2.2.	Die Infizierung von C ₆ -Zellen	61
4.3.2.3.	Die Infizierung von 3T6-und Verozellen	61
4.3.2.4.	Die Infizierung von Arthropodenzellen	62

4.3.2.4.1.	Aedes albopictus- und Aedes aegypti-Zellkulturen	62
4.3.2.4.2.	Zeckenzelllinie TTC-243	62
4.4.	Histologische Untersuchungen	63
4.4.1.	Einschlußkörperchenbildung nach Infektion von Zellkulturen	63
4.4.1.1.	Einschlußkörperchen in Schafnierenzellen	63
4.4.1.2.	Einschlußkörperchen in C ₆ -Zellen	64
4.4.2.	Histologische Veränderungen im Säugmaus-gehirn	64
4.4.3.	Histologische Veränderungen in Organen infizierter Schafe	65
5.	<u>Diskussion des experimentellen Teiles</u>	66
6.	<u>Zusammenfassung</u>	70
7.	<u>Literaturverzeichnis</u>	72
8.	<u>Lebenslauf</u>	77

Abkürzungen

BHK: Baby Hamster Kidney, Babyhamsternieren

f.KS: foetales Kälberserum

i.cer.: intracerebral

IHA: indirekte Hämagglutination

i.m.: intramuskulär

i.p.: intraperitoneal

i.v.: intravenös

KID: kulturinfektiöse Dosis (=TCID)

KS: Kälberserum

MEM: Minimum Essential Medium

MM: (Medium nach) Mitsunashi und Maramorosch

NSD: Nairobi Sheep Disease

p.appl.: post applicationem

PBS: Phosphat Buffered Saline

PBST: Phosphat Buffered Saline mit 0,25 % Trypsin

p.i.: post infectionem

p.vac.: post vaccinationem

s.c.: subcuten

TCID: Tissue Culture Infective Dose

z.p.E.: zytopathischer Effekt

1. Einleitung

Die Nairobi Sheep Disease (NSD), eine infektiöse Gastroenteritis der Schafe und Ziegen bestimmter Gebiete Afrikas, besitzt wegen ihrer Gefährlichkeit für diese kleinen Wiederkäuer große wirtschaftliche Bedeutung.

Sie wird durch ein noch relativ wenig bekanntes Virus hervorgerufen, dessen nähere Erforschung immer dringlicher wird und deshalb derzeit zunehmendes Interesse findet, gilt es doch, die Zucht der kleinen Wiederkäuer dem steigenden Bedarf einer rasch wachsenden Bevölkerung anzupassen.

Im Rahmen von Arbeiten zur Klärung ätiologischer und pathogenetischer Probleme der NSD-Virusinfektion galt es, eine für den deutschen Sprachraum erste synoptische Darstellung der Krankheit zu erarbeiten. Hierzu sollten auch eigene Erfahrungen durch Infektionsversuche an Schafen beitragen. Zur Überprüfung des Zellkulturspektrums des Erregers waren in die Untersuchungen Säugetier- und Arthropodenzellen eingeschlossen.

2. Schrifttum

2.1. Begriffsbestimmung

Die Nairobi Sheep Disease (NSD) ist eine virusbedingte, fieberhafte, nicht kontagiöse, durch Schildzecken übertragene, hämorrhagische Gastroenteritis der Schafe und Ziegen in Afrika. Der Erreger kann unter bestimmten Voraussetzungen auch für den Menschen infektiös sein, so daß die NSD als eine Arbovirus-Zoonose betrachtet werden muß.

2.2. Geschichtliches

Um das Jahr 1910 beobachteten EDWARDS (zit. bei MUGERA und CHEMA 1967 und bei KIRYA und Mitarbeitern 1972) und 1917 MONTGOMERY in der Umgebung von Nairobi (Kenia) eine verlustreiche Seuche bei Schafen und dann auch bei Ziegen, deren hervorstechendstes klinisches Merkmal eine blutige Magen-Darmentzündung war.

Es erkrankten oder starben besonders solche Tiere, die von Händlern aus dem südlichen Massailand, aber auch aus den nördlichen Grenzgebieten geholt und an Farmer im Kikuyureservat in der Umgebung von Nairobi verkauft worden waren.

Die anscheinend nicht immunen Tiere infizierten sich dort relativ bald nach ihrer Ankunft. Es wurden Mortalitätsraten von 70 - 90 % berichtet. Das Auftreten der Krankheit in der genannten Gegend gab Anlaß zu der Bezeichnung "Nairobi Sheep Disease".

Die zunächst noch ungeklärte Ätiologie und Epidemiologie konnte 1917 von MONTGOMERY aufgeklärt werden. Er wies nach, daß die Krankheit durch ein filtrierbares Virus hervorgerufen wird, das von Zecken der Spezies *Rhipicephalus appendiculatus* (braune Ohrzecke) übertragen wird.

Diese Entdeckung war zugleich bahnbrechend für die Erforschung noch anderer durch Zecken übertragener Viruserkrankungen bei Mensch und Tier, weil sie erstmals einen bis dahin noch völlig unbekannten Übertragungsweg für ein infektiöses Agens nachwies. Es ist verständlich, daß die Befunde MONTGOMERY's keine sofortige Anerkennung fanden. Die sich lange haltende Vermutung, Rickettsien (*Cowdria ruminantium*) könnten die Krankheit verursachen, bestätigte sich nicht. DAUBNEY und HUDSON konnten 1931 und 1934 die Untersuchungen von MONTGOMERY voll bestätigen und in wesentlichen Punkten ergänzen (vergleiche unten).

2.3. Verbreitung und Bedeutung

Die NSD kannte man sehr lange Zeit nur im Gebiet um Nairobi. Dort allerdings war sie wegen ihrer Gefährlichkeit für neu zugekaufte Tiere gefürchtet. Epidemiologische Untersuchungen - in der Regel handelte es sich hierbei um den Nachweis von Antikörpern und nicht um Virusisolationen - die in den letzten Jahren unternommen wurden, deckten jedoch auf, daß die Krankheit nicht nur auf das genannte Gebiet beschränkt ist. TERPSTRA (1969) untersuchte Blutproben von Schafen und Ziegen im Agar-Gel-Diffusionstest auf präzipitierende Antikörper und konnte so nachweisen, daß große Teile Kenias und Ugandas als endemisch verseucht zu gelten haben. BUGYAKI (1955 und 1957, zit. bei TERPSTRA 1969) beschrieb eine in der Umgebung des Kivu-Sees vorkommende Schafkrankheit, die wahrscheinlich mit NSD identisch ist. Aufgrund serologischer Untersuchungen äußerte TAYLOR (1967 zit. bei KIRYA et al 1972) die Meinung, daß auch im Südwesten Afrikas, so z.B. in Botswana und in der Kalahari, mit NSD gerechnet werden muß. Kisenyi in der Republik Zaire ist bis jetzt das am weitesten westlich liegende, nachgewiesene Verbreitungsgebiet. Durch den Nachweis von Antikörpern in Schafseren aus

Mozambique und Natal (Republik Südafrika) wurde vom gleichen Autor belegt, daß die Krankheit auch schon bis zum Südostrand des Kontinents vorgedrungen ist. Die neuesten Angaben stammen von DAVIES (1972), der im Neutralisationstest und im Plaque-Reduktionstest positive Sera von Schafen aus Somalia und Äthiopien nachwies. Nachdem bereits PELLEGRINI (1950, zit. bei EDELSTEN 1975) über das Vorkommen von NSD im Süden Somalias berichtet hatte, beschrieb EDELSTEN (1975) eine schwere NSD-Epidemie in Nord-somalia in den Jahren 1969 - 1972. Bis zu 80 % der Herden waren innerhalb dieser dreijährigen Beobachtungsperiode betroffen. Die Morbidität bei Schafen betrug 30 - 70 %, die Mortalität 50 - 80 %. In Ziegen verlief die Infektion wesentlich milder. Hier schätzte der Autor die Mortalität auf ca. 10 %. Nach EDELSTEN (1975) ist die wahre Ursache des klinischen Begriffes "Zeckenfieber" zu 90 % der Fälle NSD. Den restlichen 10 % sollen Infektionen mit *Cowdria ruminantium*, *Babesien* und *Pasteurella pneumoniae* zugrunde liegen.

Die genannten Daten bieten noch kein vollständiges und gesichertes Bild über das Vorkommen der NSD in Afrika. Sie erwecken jedoch den Eindruck, daß die Krankheit viel weiter verbreitet ist, als bisher nachgewiesen wurde. Man darf vermuten, daß NSD in noch mehr Ländern Afrikas festgestellt werden kann, sobald entsprechende Erhebungen durchgeführt werden.

Von großer Bedeutung ist jedoch, daß, wie zum ersten Mal schon MONTGOMERY (1917) berichtete, NSD nicht nur Schafe, sondern auch Ziegen befällt. Für die fortschreitende Entwicklung der ländlichen Gebiete Afrikas treten hier erhebliche Probleme auf. Die einheimischen Schaf- und Ziegenherden sind zwar in endemischen NSD-Gebieten zu einem relativ hohen Prozentsatz durchseucht und daher immun. Zur Verbesserung der Milch- und Fleischerträge sowie der Wollqualität dieser Lokalrassen werden aber immer öfter exotische Rassen wie Corriedale- und Merinoschafe eingeführt. Diese voll empfänglichen Tiere erkranken mit

einer recht hohen Mortalitätsrate, was viele Zuchtprogramme zur Verbesserung der Landeszucht sehr erschwert, biszuweilen fast völlig zunichte macht. Doch auch einheimische Schafe und Ziegen, die aus NSD-freien Gebieten durch Zukauf in endemisch verseuchte kommen, fallen oft der Krankheit zum Opfer. Darüberhinaus besteht die Gefahr, daß Tiere von Herden aus verseuchten Gebieten die Krankheit mit infektiösen Zecken in bis dahin noch freie Gebiete verschleppen. Hierbei kann sogar gelegentlich der Fall eintreten, daß auch andere Zeckenspezies als *Rhipicephalus appendiculatus*, nämlich *Amblyomma*-Arten bzw. *Rhipicephalus pulchellus*, das Virus weitertragen (DAUBNEY und HUDSON 1934, EDELSTEN 1975, vgl. 2.4.1.2.).

Bisherige Versuche, die Krankheit durch Impfung prophylaktisch zu bekämpfen, führten noch nicht zum gewünschten Ziel, weil ein wirksamer und unschädlicher Impfstoff noch nicht zur Verfügung steht. Maßnahmen, welche die Weiterverbreitung der Krankheit verhindern sollen, müssen sich deshalb noch in erster Linie auf eine Zeckenbekämpfung beschränken. Sie sind aus vielerlei Gründen mit erheblichen Problemen belastet. Die NSD wird demnach für die Zucht und Haltung der kleinen Wiederkäuer in vielen Gegenden Afrikas auch in den nächsten Jahren von großer Bedeutung sein.

2.4. Erreger

2.4.1. Biologische Eigenschaften

2.4.1.1. Zellspektrum

HOWARTH und TERPSTRA gelang es 1965 erstmals, NSD-Virus in Zellkulturen zu züchten. Sie beimpften sekundäre Nieren- und Hodenzellkulturen aus Organen junger Ziegen, sowie sekundäre Nierenzellen von 20 Tage alten Hamstern mit

virushaltigem Mäusegehirn. Die Tiere waren intracerebrally (i. cer.) mit Gewebematerial erkrankter Schafe infiziert worden. In Ziegenhodenkulturen kam es zu keinem zytopathischen Effekt (z.p.E.), wohl aber in den Hamster- und Ziegennierenzellen. Durch Inokulation von Kulturmedium in Mäuse konnten die Autoren nicht nur eine mit dem z.p.E. gekoppelte Virusvermehrung nachweisen, sondern auch eine ohne z.p.E. ablaufende Virusreproduktion in Hodenzellen. Die Spezifität der Viruszüchtung in Ziegen- und Hamsternierenzellkulturen wurde durch die erfolgreiche Infizierung von Schafen mit Kulturmaterial bewiesen. Die Tiere erkrankten mit typischen Symptomen.

COACKLEY und PINI (1965) infizierten Deckglaskulturen von primären Lammnieren- und -hodenzellen sowie Zellen einer Babyhamsternierenzelllinie mit NSD-Virus.

Sie konnten in infizierten Zellen nach Färbung mit Hämatoxylin-Eosin intrazytoplasmatisch gelegene eosinophile Einschlusskörperchen nachweisen.

Inzwischen haben sich BHK (baby hamster kidney)-Zellen, i.d.R. die Zelllinie BHK 21/13, als das am meisten verwendete Zellsystem herausgestellt (COACKLEY und PINI 1965; TERPSTRA 1969; DAVIES 1972, DAVIES et al 1974; JESSETT et al 1976; MUGERA und CHEMA 1967; OHDER und Mitarbeiter 1970). Die Verwendung von BHK-Zellen bietet gegenüber primären bzw. sekundären Kulturen von Schaf-, Ziegen- und Hamsternieren wesentliche arbeitstechnische Vorteile, weil vor allem Schwierigkeiten der Organbeschaffung entfallen.

Nach HOWARTH und TERPSTRA (1965) sowie COACKLEY und PINI (1965) treten erste zytopathische Veränderungen in infizierten Zellkulturen (BHK- bzw. Lammnierenzellen) nach Inokulation von Feldmaterial oder von in Mäusegehirnen passiertem Virus i.d.R. nach 2 - 4 Tagen auf. Sie sind zuerst durch Granulierung und Schrumpfung einzelner Zellgruppen zu erkennen. Bald darauf kommt es zu Abkugelung und Ablösung der Zellen. COACKLEY und PINI (1965) beschrieben,

daß es meist nicht zu einer vollständigen Zerstörung des Zellrasens kommt, und besonders bei der von ihnen geprüften BHK-Zelllinie die restlichen ungeschädigten Zellen wieder einen neuen Rasen bilden können, der dann nach einiger Zeit seinerseits zytopathisch verändert wird.

Nach HOWARTH und TERPSTRA (1965) hängt das Auftreten und die Ausbildung des z.p.E. von der beimpften Zellart ab. Bei Ziegenmierenzellen konnten sie erst nach 6 Passagen zytopathische Veränderungen beobachten, während bei Ziegenhodenkulturen nach 8 Passagen noch kein z.p.E. auftrat. COACKLEY und PINI (1965) berichteten, daß mit "kürzlich isolierten Virusstämmen" der z.p.E. verzögert auftrat.

Nach HOWARTH und TERPSTRA (1965)

werden in Ziegenmieren- bzw. BHK-Zellen maximale Virustiter von jeweils $3,5 \log$ Mäuse LD_{50} pro 0,03 ml Gewebekulturflüssigkeit erreicht. Die Mäuse waren 5 - 6 Wochen alt. TERPSTRA (1969) berichtete von Virusernten aus ultraschallbehandelten BHK 21/13-Zellen, deren Titer 10^4 TCID₅₀/ml (tissue culture infective dose) überstieg. DAVIES et al (1974) erreichten mit derselben Zelllinie in Rollerkulturen zwischen 10^5 bis 10^6 TCID₅₀/0,1 ml.

Nach COACKLEY und PINI (1965) sind im Plasma gefärbter infizierter Zellen Einschlußkörperchen nachzuweisen. Sie imponieren als unregelmäßige, teils band-, teils ringförmige, den Kern umschließende Gebilde.

OHDER und Mitarbeiter (1970) verfolgten Wachstum und Entwicklung von Nairobi Sheep Disease-Virus in BHK 21/13-Zellen mit Hilfe der direkten Immunofluoreszenztechnik. Sie beimpften die Zellen mit einem Virusstamm, der über 100 mal in Babymausgehirnen und dann 8 mal in BHK-Zellen passiert worden war. Schon 12 Stunden p.i. beobachteten sie deutliche helle Flecken im Zytoplasma einiger Zellen, deren Fluoreszenz sich noch intensivierte. Ab 18 Stunden p.i. zeigten sich kokkoide und kommaförmige fluoreszierende Gebilde im gesamten Zytoplasma und noch später wurden sehr

helle bipolare oder spiralige Areale sichtbar. Durch gleichzeitige Titration des Virus in BHK-Zellen konnten OHDER und seine Mitarbeiter zeigen, daß Virustiter und Zellinfektionsrate in ungefähr parallelem Verlauf ansteigen. JESSETT et al (1976) verglichen die Ergebnisse, die sie beim Nachweis von Antikörpern gegen NSD-Virus durch den indirekten Hämagglutinationstest und die indirekte Immunofluoreszenz erzielten und fanden, daß diese eng korrelierten.

ANSELL (1957) versuchte erfolglos, das Virus der NSD in embryonierten Hühnereiern zu züchten. Dies gelang jedoch TERPSTRA (1968, zit. bei TERPSTRA 1969), der einen attenuierten Virusstamm passierte.

2.4.1.2. Wirtsspektrum

Natürlicherweise empfänglich für das Virus der NSD sind Schafe und Ziegen aller Rassen, wobei allerdings sogenannte "exotische", das heißt nicht-afrikanische, Schafrassen, wie z.B. Corriedale- und Merinoschafe, anscheinend weniger schwer erkranken und weniger häufig sterben als ostafrikanische Fettschwanzschafe (TERPSTRA 1969). DAUBNEY und HUDSON (1934) beschrieben jedoch eine schwer verlaufende Epidemie auf einer Merinoschaffarm westlich des Mount Kenya, wobei in 2 Monaten 1200 Schafe verendeten.

Über die Empfänglichkeit anderer Haus- und Wildwiederkäuer ist nicht viel bekannt. MONTGOMERY (1917) gelang es nicht, Rinder und indische Büffel zu infizieren. Außerdem zitierte TERPSTRA (1969) einen Fall, wonach im Zoo von Entebbe zwei Schopfducker (*Cephalophus caeruleus*) starben, bei denen post mortem pathologische Veränderungen diagnostiziert wurden, die denen von NSD sehr ähnlich waren. WEINBREN (1958, zit. bei TERPSTRA 1969) konnte aus diesen Tieren angeblich einen Erreger isolieren, der in seinen Eigenschaften dem NSD-Virus glich.

DAUBNEY und HUDSON (1934) prüften die Empfänglichkeit verschiedener Nagetierspezies durch intraperitoneale Injektion von virushaltigem Schafblut. Aus Kaninchen und weißen Ratten konnten sie kein Virus rückisolieren, doch in afrikanischen Feldratten (*Arvicanthus abyssinicus nairobiae*) war 4 Tage lang eine Virämie nachweisbar, ohne daß Krankheitssymptome auftraten. Nach einer zweiten Injektion ließ sich kein Virus mehr aus dem Blut isolieren. Offenbar waren die Tiere durch die Erstinfektion immun geworden. Im Gegensatz dazu gelang es DAVIES (1972), bei Kaninchen eine, wenn auch kurze (bis 48 Std. p.i.), Virämie zu induzieren.

ANSELL (1957) konnte erstmals NSD-Virus im Gehirn adulter weißer Mäuse zur Vermehrung bringen. Die Tiere erkrankten in der Regel 3 - 4 Tage p.i. . Zuerst kam es zu Futterverweigerung und gesträubtem Fell. Wenn die Tiere am Schwanz hochgehoben wurden, zeigten sie zunächst zitternde Bewegungen der Gliedmaßen, später kam es zu Streckkrämpfen der Vorder- und Hinterbeine und zu Atemstillstand. Innerhalb 12 Stunden nach dem ersten Auftreten dieser Symptome trat der Tod ein.

Weißer Mäuse sind seither das wichtigste Versuchstier sowohl für die Virusisolation bzw. den -nachweis, als auch für die Viruszüchtung. Die Empfänglichkeit von Babymäusen ist sogar noch größer als die der erwachsenen Tiere. Die Infektion geht sowohl nach i. cer. als auch nach i.p. Inokulation gut an (WEINBREN et al 1958).

2.4.1.2.1. Das Virus der NSD in seinen Vektoren

Die braune Ohrzecke *Rhipicephalus appendiculatus* (*R. appendiculatus*) ist der wichtigste natürlich Überträger der NSD. Es handelt sich hierbei um eine 3-wirtige Zecke aus der Familie der Schildzecken. Sie kommt hauptsächlich in Zentral- und Ostafrika vor. Ihr Verbreitungsgebiet er-

streckt sich von Transvaal (Südafrika) bis zur Äquatorialprovinz im Sudan und Äthiopien im Norden. Als Westgrenze des Vorkommens gilt Nordangola und die Provinz Leopoldville im Kongo (ELBL und ANASTOS 1966). Die braune Ohrzecke bevorzugt das gering bewaldete Buschgrasland feuchten Typs und eventuell den Waldrand, nicht jedoch den Wald selbst oder offenes, trockenes Grasland und ist von 0 bis ca. 2500 m Meereshöhe anzutreffen (WALKER 1974). Je nach Feuchtigkeit und Temperatur dauert der gesamte Entwicklungszyklus 61 - 202 Tage (ELBL und ANASTOS 1966).

Der am häufigsten befallene Wirt von *R. appendiculatus* ist das Rind, doch sind oft auch Ziegen und Schafe, seltener Pferde, Esel und Maultiere befallen, sowie bei Wildtieren Büffel und Antilopen (ELBL und ANASTOS 1966). Die bevorzugte Anheftungsstelle auf dem Tier selbst ist die Innenseite und der Margus anterior des Ohres (hier sitzen bis zu 80 % der Zecken), seltener die Hornbasis, die Auglider oder die Wangen.

Die Aufdeckung des Übertragungszyklus von NSD gelang MONTGOMERY (1917). Er konnte nicht mit Nymphen, jedoch mit adulten Zecken, die als Nymphen an natürlich oder experimentell infizierten Schafen gesaugt hatten, die Krankheit auf empfängliche Tiere übertragen. Es war der erste Nachweis einer Virusübertragung durch Zecken.

Den Beweis, daß auch Larven und Nymphen die Krankheit übertragen können, führten schließlich DAUBNEY und HUDSON (1931). Sie bewiesen damit zugleich erstmals die transovarielle Übertragung eines Virus von einem Zeckenweibchen auf seine Nachkommenschaft.

Die Infektion der Zecken erfolgt durch Aufnahme virushaltigen Blutes. Die Weitergabe des Virus auf empfängliche Wirte ist jedoch erst nach einer bestimmten Zeit möglich, die allgemein als extrinsische Inkubationszeit bezeichnet wird. Man darf in Analogie zu den Befunden bei anderen

durch Zecken übertragenen Virusinfektionen schließen, daß das Virus aus dem Darm der Zecke in die Speicheldrüse gelangt, wo eine Virusvermehrung stattfinden muß. Näheres ist über diese Vorgänge jedoch bei der NSD noch nicht bekannt. Die extrinsische Inkubationszeit hängt von der Umgebungstemperatur ab. *R. appendiculatus*-Zecken verschiedener Entwicklungsstadien waren nach den Erfahrungen von DAUBNEY und HUDSON (1931) erst nach ihrer Häutung wieder infektiös (Ausnahme: Männchen, vgl. unten). Saugt eine infektiöse Zecke auf einem nicht immunen und nicht infizierten Tier, so "reinigt" sie sich vom Erreger, das heißt, sie verliert ihre Infektiosität. Das der Häutung folgende Entwicklungsstadium ist demnach virusfrei. Es ist jedoch möglich, daß eine Zecke von einem sich im virämischen Zustand befindenden Tier Blut saugt und sich damit reinfiziert. Auf diese Weise wird dann das Virus auf die nächste Entwicklungsstufe oder von weiblichen Tieren transovariell auf die folgende Zeckengeneration übertragen.

Die in den Zeckenstadien ablaufende Virusvermehrung führt zu keiner merkbaren Schädigung der Parasiten. Doch scheinen Zecken-Schaf-Zecken-Passagen die Virulenz des Erregers zu steigern, woraus eine verkürzte Inkubationszeit resultiert (DAUBNEY und HUDSON 1931).

Von großer epidemiologischer Bedeutung ist, wie lange einzelne Zeckenstadien infektiös bleiben können. MONTGOMERY (1917) konnte nachweisen, daß Weiden, auf denen virushaltige *R. appendiculatus*-Zecken von an NSD verendeten Schafen abgefallen waren, noch nach 9 Monaten für empfängliche Tiere gefährlich waren. MONTGOMERY empfahl deshalb, solche infizierten Weiden wenigstens 18 Monate nicht mehr zu benutzen.

LEWIS (1946) prüfte, wie lange die Entwicklungsstadien von *R. appendiculatus* infektiös bleiben. Danach konnten

186 Tage alte Larven nach einer Inkubationszeit von 8 Tagen eine Fieberreaktion bei Merinoschafen hervorrufen. Schafe, die mit 245 Tage alten Larven besetzt wurden, zeigten erst nach 14 Tagen einen kurzen, geringfügigen Temperaturanstieg. Diese Infektion verlieh bereits einen teilweisen Schutz gegen eine Reinfektion. 294 Tage alte Larven konnten die Haut der Schafe nicht mehr durchdringen und starben, ohne Blut gesaugt zu haben.

Bei als Larven infizierten Nymphen war die Situation ähnlich. Nach 359 Tagen gelang es nur noch einer Nymphe, sich an einem Schaf vollzusaugen und es erfolgreich zu infizieren.

In adulten Zecken konnte LEWIS (1946) noch länger lebensfähiges Virus nachweisen. 871 Tage nach ihrer Häutung wurde damit ein Schaf mit tödlichem Ausgang infiziert.

Die Übertragungsverhältnisse sind bei männlichen Zecken etwas anders gelagert. Sie können den Saugakt für die Zeit der Befruchtung unterbrechen. Auf der Suche nach weiblichen Zecken können sie einen Wirt, z.B. ein Schaf, verlassen, zu einem zweiten wechseln, dort vorhandene weibliche Zecken befruchten, wieder Blut saugen und dabei die Infektion übertragen (LEWIS 1946). Man darf schließen, daß Zecken aller Entwicklungsstadien, die virushaltiges Blut aufgenommen haben, so lange infektiös sind, wie sie nach der Häutung überleben.

DAUBNEY und HUDSON (1934) beobachteten im Gebiet westlich des Mount Kenya (Leikipia-Ebene), daß nicht nur *R. appendiculatus* NSD-Virus übertragen kann, sondern, daß auch andere Zeckenspezies mitwirken müssen. Die dort am häufigsten anzutreffenden Zeckenarten waren verschiedene *Hyalomma* spezial, während *Rhipicephalus simus* und *pulchellus* seltener vorkamen. *Amblyomma variegatum* war zwar weit verbreitet, doch nie sehr zahlreich vorhanden. Die gleichen Autoren beobachteten auch im Gebiet der Athi-Ebene südöstlich von Nairobi NSD-Ausbrüche, obwohl für die dortige

Gegend das Vorkommen von *R. appendiculatus* nicht bekannt war. Statt dessen fand man nach der Häufigkeit ihres Vorkommens *Rhipicephalus simus*, *R. pulchellus*, *Amblyomma variegatum*, *R. evertsi* und *R. bursa*. DAUBNEY und HUDSON (1934) konnten allerdings nur bei *A. variegatum* eine Virusübertragung nachweisen. Bei dieser Zeckenspezies wird das Virus wohl von Stadium zu Stadium, jedoch nicht transovariell auf die Eier und damit auf die nächste Zeckengeneration weitergegeben.

Nach PEGRAM (zit. bei EDELSTEN 1975) sollen auch in Nordsomalia häufig Ausbrüche von NSD festgestellt werden, ohne daß dort *R. appendiculatus* vorkommt. Da die Erkrankung hier weiter verbreitet war als die Zecke *Amblyomma variegatum*, vermutete LEWIS (1949), daß *A. gemma*, *Rhipicephalus pulchellus* und *R. simus* als Überträger fungieren könnten. PELLEGRINI (1950, zit. bei EDELSTEN 1975) bemerkte, daß sich die Verbreitung von *R. pulchellus* mit dem Vorkommen von NSD deckte und diese Zecken meist auf kranken Ziegen und Schafen zu finden waren. Er konnte beweisen, daß das Virus auch in *R. pulchellus* transovariell weitergegeben wird. In Nordsomalia dürfte demnach diese Zeckenart Hauptvektor für NSD sein (EDELSTEN 1975).

2.4.1.2.2. NSD-Virusinfektion des Menschen

Erste Hinweise auf die Möglichkeit einer Infektion des Menschen mit dem Virus der NSD stammen von WEINBREN (1959a). Er fand in 60 von 312 Seren (ca. 18 %) von Einwohnern Ostafrikas virusneutralisierende Antikörper. KIRYA et al (1972) beschrieben eine NSD-Infektion bei einem 16-jährigen Mann aus Uganda. Die Krankheit begann mit Kopfschmerzen, Fieber und Bauchschmerzen. Die Temperatur ging am 4. Krankheitstag wieder auf Normalwerte zurück, doch blieben Rückenschmerzen über 14 Tage bestehen. Infantile Mäuse, denen man Serum vom 1. Krankheitstag i.cer., i.p.

und s.c. appliziert hatte, erkrankten und starben am 5. Tag p. appl. ebenso wie adulte Mäuse, die das Serum i.cer. erhalten hatten. Den Autoren gelang es nicht, in virushaltigem Hirnmaterial nach 4 Mäusepassagen bei verschiedenen pH-Werten ein Hämagglutinin nachzuweisen. In der Komplementbindungsreaktion (KBR) zeigte ein während der akuten Krankheitsphase gewonnenes Serum gegen NSD-Antigen einen positiven Titer von 1:40. Ein vierfacher Titeranstieg konnte 48 Tage nach Erkrankungsbeginn nachgewiesen werden. Mittels Kreuzneutralisationstesten in 2 Tagen alten Mäusen ließ sich eine enge Verwandtschaft des aus dem Patienten isolierten Virus mit einem NSD-Laborstamm, wenn nicht sogar eine Identität feststellen. Die Autoren vermuten, daß der Patient auf natürliche Weise infiziert worden war. Zwar hatte der Mann mit Schafen und Ziegen Kontakt gehabt, doch konnte bei diesen Tieren keine NSD-Infektion nachgewiesen werden. Man darf annehmen, daß eine Infektion des Menschen mit dem NSD-Virus prinzipiell möglich ist. Sie wird aber ein seltenes und höchstwahrscheinlich gutartig ablaufendes Ereignis sein. Die zitierten Befunde erlauben jedoch, die NSD als Zoonose zu bezeichnen.

2.4.2. Chemisch-physikalische Eigenschaften

2.4.2.1. Nukleinsäuretyp

TERPSTRA (1969) bestimmte den Nukleinsäuretyp des NSD-Virus, indem er den Erreger in BHK 21/13-Zellen unter Zusatz von 10^{-5} Mol 5-Brom-2-Desoxy-Uridin (BDU) züchtete. Das Virus wurde kaum in seiner Entwicklung gehemmt. Dies bedeutet, daß der Erreger der NSD zu den RNS-haltigen Viren gehört.

2.4.2.2. Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen und chemisch-physikalischen Faktoren

MONTGOMERY (1917) fand, daß bei Temperaturen zwischen $15 - 18^{\circ}\text{C}$ NSD-Virus 28 - 45 Tage in Zitratblut infektiös bleibt. Unter den gleichen Bedingungen verkürzte sich die Überlebensdauer in Oxalatcarbolglycerin auf 8 - 14 Tage. DAUBNEY und HUDSON (1931) konnten NSD-Virus bei $\pm 5^{\circ}\text{C}$ in einer Zitrat-Salzlösung mindestens 66 Tage infektiös halten, bei gleichen Temperaturen in Oxalatcarbolglycerin 93 Tage. Mit virushaltigem Schafblut, das über H_2SO_4 getrocknet worden war, konnten 2 Schafe noch nach 143 Tagen infiziert werden. TERPSTRA (1969) verglich einen virulenten Feldstamm aus Schafblut und ein über 180 Passagen in Mäusegehirnen adaptiertes Virus. Serumproben und homogenisierte Hirnsuspensionen wurden mit Antibiotika behandelt und nach Lagerung bei 4°C und bei 37°C in Mäusen titriert. Der Autor fand, daß bei 37°C das Feldvirus seine Infektiosität signifikant weniger schnell verloren hatte als das attenuierte Virus. Die Halbwertszeit für ersteres betrug 104,4, für letzteres dagegen 51,3 Minuten. Bei 4°C fand er keinen signifikanten Unterschied zwischen dem virulenten und dem attenuierten Erreger, da die aus dem Regressionskoeffizienten abgelesenen Halbwertszeiten 2,7 bzw. 3,4 Tage betrugen. TERPSTRA (1969) untersuchte die Empfindlichkeit von NSD-Mäusegehirn-Virus (4 Teile) gegenüber Diäthyläther (1 Teil) und Natriumdesoxycholat (1 Teil NDC 1 %ig + 1 Teil Mäusegehirnsuspension 1 %ig). Eine Virussuspension, die damit 3 Stunden lang bei $24,5^{\circ}\text{C}$ und pH 3,0 behandelt worden war, erwies sich gegenüber einer bei pH 7,2 gehaltenen Kontrolle als für Mäuse nicht mehr infektiös.

2.4.3. Morphologie

Die ersten Angaben zur Morphologie des NSD-Virus stammen von TERPSTRA (1969). Er fertigte dazu Dünnschnitte aus mit Glutaraldehyd fixierten und mit Bleizitrat kontrastierten Aralditblöcken von BHK 21/13 Zellen 3 Tage p.i. an. Bei 7000facher Vergrößerung waren zahlreiche, 300 - 1500 nm messende Vakuolen und eine mehrere Mikron breite amorphe Masse erkennbar, die er für identisch mit den in gefärbten Präparaten sichtbaren Einschlusskörperchen hielt. Bei stärkeren Vergrößerungen (35 000 bis 200 000fach) fand TERPSTRA in diesen Vakuolen mehr oder weniger dicht gelagerte, runde, ovale und längliche Partikel, die von einer Doppelmembran umgeben waren. Die rundlichen Formen maßen durchschnittlich 70 ± 15 mal 80 ± 17 nm, die länglichen waren bei einem Querschnitt von 60 nm bis zu 500 nm lang, wobei runde oder ovale Partikel viel häufiger waren als längliche. TERPSTRA (1969) vermutete, daß die runden Formen Quer- und Schrägschnitte der langen Formen darstellten. Die außerhalb der Zelle gelegenen Partikel glichen den in den Vakuolen. "Precursor"-Partikel oder "Budding"-Prozesse konnte der Autor nicht beobachten.

MUNZ und GÖBEL (1977) konnten jüngst diese Befunde ergänzen. Die Autoren untersuchten infizierte BHK 13-Zellen nach Fixation mit Glutaraldehyd, Schnittkontrastierung mit Uranylacetat und Bleizitrat. Sie konnten ebenfalls in Vakuolen des Zytoplasmas liegende Partikel von unterschiedlicher Größe und Form nachweisen. So fanden sie einmal die von TERPSTRA beschriebenen unterschiedlich langen, bis 730 nm messenden schlangenförmigen Gebilde, die einen Gesamtdurchmesser von ca. 50 - 60 nm hatten und von einer Doppelmembran begrenzt waren. Bedingt durch die Schnitttechnik kamen die verschiedenartigsten Formen zur Darstellung: Gerade und gebogene, lange, kurze oder ovale Partikel. Es fiel auf, daß ihre Zahl in den Vakuolen

nicht sehr groß ist. Bei manchen Aufnahmen hatten die Autoren den Eindruck, daß in den gestreckten Partikeln helikale Strukturen zu erkennen seien. Darüberhinaus wurden noch nicht beschriebene Partikelansammlungen gefunden: Sie erweckten den Anschein, als ob es in Vakuolen zu einer Partikel- bzw. Virusanhäufung gekommen sei. Hier dominierten mehr runde, ebenfalls von Doppelmembranen begrenzte Gebilde mit Durchmessern von 55-65-70 nm. Die Vakuolen selbst waren von einer einfachen Membran umgeben.

MUNZ und GÖBEL (1977) vermuten, daß die oben beschriebenen länglichen, in Vakuolen liegenden Formen den Beginn der Virusvermehrung darstellen, zumal auf manchen Bildern deutliche "budding"-Prozesse festzustellen sind. Die dicht gelagerten, rundlichen Partikel deuten die Autoren dagegen als Endstufe der intrazellulären Virusvermehrung. Nähere Angaben können sie noch nicht machen.

Die Befunde unterstützen nach MUNZ und GÖBEL (1977) die Meinung, daß das NSD-Virus morphologisch den Bunyaviren zuzurechnen ist. Ehe jedoch nicht isolierte bzw. gereinigte Viruspartikel im Negativ-staining-Verfahren dargestellt sind, sollte man sich hierzu noch nicht definitiv äußern.

2.4.4. Serologische Eigenschaften

Das NSD-Virus besitzt virusneutralisierende, komplement-bindende und präzipitierende Aktivitäten, die in infizierten Tieren korrespondierende Antikörper hervorrufen. TERPSTRA (1969) konnte mit virushaltigem Mäusegehirnmaterial als Antigen komplementbindende Antikörper in Hyperimmunseren von Mäusen nachweisen. Der Test wird von TERPSTRA für spezifisch gehalten. Mit Hyperimmunseren gegen 14 verschiedene Arboviren aus Ostafrika erfolgte keine Komplementbindung unter Verwendung von NSD-Antigen.

In Schafen und Ziegen waren 10 bis 20 Tage p.i. komplementbindende Antikörper nachweisbar. Ihre Titer stiegen bis 1:20 bzw. 1:80 an, um dann jedoch nach 5 Wochen abzufallen. Sechs Monate p.i. waren sie ganz verschwunden. Eine Boosterung mit 150 000 Mäuse LD₅₀ einer 115. Mäusegehirnpassage 5 Wochen nach der Erstimpfung mit 8000 Mäuse LD₅₀ der 114. Mäusegehirnpassage erhöhte die Titer um das 2 - 8fache, eine statistisch signifikante Verlängerung der Antikörperpersistenz gegenüber einer nicht geboosterten Tiergruppe wurde jedoch nicht erreicht.

Für die Diagnose einer NSD-Infektion eignet sich am besten der Nachweis präzipitierender Antikörper. Ein bis zwei Tage, nach dem das Virus aus dem Blut verschwunden war (d.h. ca. 1 bis 2 Wochen p.i.), konnte TERPSTRA (1969) in Schafseren präzipitierende Antikörper nachweisen. Sie persistierten mindestens ein Jahr lang, bei Ziegen sogar über 1 1/2 Jahre. Unterschiede zwischen virulentem Feldvirus bzw. Mäusegehirn- oder Zellkultur adaptiertem Virus bestanden hierbei nicht. Die Präzipitationstiter von Mäusehyperimmunseren waren im Agar-Gel-Diffusionstest jedoch 10 - 80 mal niedriger als die Titer komplementbindender Antikörper. TERPSTRA (1969) schlug deshalb vor, diesen Test nicht für quantitative Antikörperuntersuchungen zu verwenden.

Für den Nachweis virusneutralisierender Antikörper im Neutralisationstest verwendete TERPSTRA (1969) Virus aus ultraschallbehandelten Zellkulturen, die erste Anzeichen eines z.p.E. zeigten. Er erzielte auf diese Weise Virus-suspensionen mit Titern von über 10^4 TCID₅₀/ml, die als Antigenausgangsmaterial verwendet werden konnten. TERPSTRA hielt eine spezifische Neutralisation dann für gegeben, wenn 100 TCID₅₀ durch Serumverdünnungen von 1:80 und höher neutralisiert wurden. Derartige Seren stammten in der Regel von Tieren, die gegen eine Reinfektion immun waren. Bei Verwendung der Zelllinie BHK 21/13 anstelle

sekundärer Hamsternierenkulturen wurden schlechtere Ergebnisse erzielt. Nach dem gleichen Autor ist auch ein Neutralisationstest in adulten Mäusen durchführbar.

DAVIES (1972) entwickelte mit zwei an BHK-Zellen adaptierten NSD-Virusstämmen einen Plaque-reduktionstest zum Nachweis von virusneutralisierenden Antikörpern. Parallel dazu benutzte DAVIES den üblichen Neutralisationstest in Röhrchen unter Verwendung von BHK-Zellen, dessen Empfindlichkeit er dadurch erhöhte, daß er junge, noch nicht ganz dichte Zellrasen beimpfte, die Adsorptionszeit bei 37°C verlängerte und das Virus in serumfreiem Medium verdünnte. Beide Tests erwiesen sich als einander praktisch gleichwertig. In Seren von Schafen aus Somalia konnten nur relativ niedrige Antikörpertiter nachgewiesen werden.

Hämagglutinin in infizierten Geweben mit üblichen Methoden zu finden, ist anscheinend nicht möglich. TERPSTRA (1969) gelang es nicht, unter Verwendung von Erythrozyten von Schafen, Gänsen, Eintagsküken, Meerschweinchen und Menschen (Blutgruppe O) in infizierten, Saccharose-Aceton-extrahierten Mäusegehirnen und in infizierten BHK 21/13-Zellen einen Hämagglutiningehalt festzustellen.

JESSETT und Mitarbeiter (1976)

konnten jedoch einen indirekten Hämagglutinationstest zum Nachweis von Antikörpern gegen NSD-Virus entwickeln. Als Antigenausgangsmaterial verwandten die Autoren ein 45 mal in BHK 21/13-Zellen und 1 mal in Saugmausgehirnen passiertes NSD-Virus (NSDV/HP) und ein Feldvirus, das 4 mal in Saugmausgehirnen passiert worden war (NSDV/LP). Als Indikatorsystem dienten tanninbehandelte und sensibilisierte Schäferythrozyten. Die zu testenden inaktivierten Seren (von Schafen, Ziegen und Kaninchen) wurden zunächst eine Stunde lang mit tanninbehandelten roten Blutkörperchen inkubiert und dann davon entsprechende Verdünnungen mit tanninbehandelten und sensibilisierten Zellen über Nacht

bei +4°C stehen gelassen. Die Autoren konnten sowohl mit NSDV/HP als auch mit NSDV/LP Antikörpertiter bis zu 5120 in Kaninchen induzieren. In Seren von mit virushaltigen BHK-Zellen infizierten Kaninchen ließen sich ebenfalls Antikörpertiter feststellen. Bei einem Vergleich von Schaf- und Ziegenserum aus dem Feld erzielten JESSETT et al mit dem indirekten Immunofluoreszenz- und dem indirekten Hämagglutinationstest fast gleiche Ergebnisse, wenn im indirekten Hämagglutinationstest Serumverdünnungen von 1:80 zum Vergleich herangezogen wurden. Die IHA-Titer betrugen bei 4 von 17 Schafserum und 10 von 26 Ziegenserum 5120 bis 40 960 (reziproker Wert der Serumverdünnung). Die Autoren verwiesen auf die Spezifität der Ergebnisse unter Hinweis darauf, daß gegen andere wichtige Arboviren, bzw. deren Immunserum keine Kreuzreaktionen auftraten. DAVIES et al (1976) untersuchten die Antikörperbildung und -persistenz bei Schafen, die mit 10⁴ Mäuse LD₅₀ eines NSD-Virusstammes infiziert worden waren. Mit der KBR konnten sie 6 - 9 Monate lang, mit der IHA und der direkten Immunofluoreszenz 15 Monate lang Antikörper nachweisen. Das Serum der infizierten Schafe zeigte keine nennenswerten virusneutralisierenden Eigenschaften.

2.4.5. Klassifizierung des NSD-Virus

Nach Fenner (1976) wird das NSD-Virus als ein mögliches Mitglied der Familie Bunyaviridae bezeichnet. Die Familie Bunyaviridae umfaßt sphärische, behüllte Viruspartikel von 90 - 100 nm Durchmesser. Die Hülle der Virionen enthält wenigstens ein virusspezifisches Glykoproteid. Das in 3 Segmente geteilte Virusgenom besteht aus einsträngiger RNS mit einem Molekulargewicht von 6 - 7 x 10⁶. Die Entwicklung der Viren der Familie Bunyaviridae erfolgt im Zytoplasma, die reifen Partikel entstehen durch einen Knospungsprozess in Vesikel beim oder in dem Golgiapparat. Der Genus Bunyavirus mit dem typenspezifischen Bunyamveravirus enthält mindestens 84 Virusspezies, die zwar mitein-

ander verwandt, andererseits aber doch in 10 serologische Gruppen und einige ungruppierte Virusarten unterteilt sind. Die Bunyaviren werden meist durch Moskitos, einige auch durch Zecken oder Phlebotomen übertragen.

Das NSD-Virus ist mit dem entfernt serologisch verwandten Dugbe- und Ganjam-Virus in einer der 10 Gruppen vereinigt.

DAVIES (zit. bei CASALS 1975) hatte eine starke Kreuzreaktion zwischen einem NSD-Antigen und einer polyvalenten Immunszitesflüssigkeit, die Antikörper gegen das Kongo-, Bhanja-, Dugbe-, Ganjam- und das Hazara-Virus enthielt, bemerkt. In der KBR zeigte sich bei Verwendung eines NSD-Mäuseimmunserums und der oben genannten Antigene eine enge Verwandtschaft des NSD-Virus mit dem Ganjam-Virus. Das Ganjam-Virus, das vor etwa 20 Jahren in Indien entdeckt worden war, konnte allerdings noch mit keiner Erkrankung bei Mensch und Haustier in Verbindung gebracht werden.

Mit der oben angegebenen Morphologie der Mitglieder der Familie Bunyaviridae stimmt die beschriebene Gestalt der intrazellulär gelegenen Viruspartikel nicht immer überein. Offen bleibt vor allen Dingen die Natur und Bedeutung der 500 - 700 nm langen Partikel.

Isolierte NSD-Virionen wurden bisher noch nicht dargestellt.

2.5. Die Krankheit

2.5.1. Inkubationszeit

Unter natürlichen Feldbedingungen kommt es etwa 5 - 6 Tage, nachdem empfängliche Tiere auf eine mit infizierten Zecken verseuchte Weide getrieben wurden, zum Ausbruch von NSD (DAUBNEY und HUDSON 1931, TERPSTRA 1969). Bei Versuchen mit infizierten Zecken betrug die Inkubationszeit 4 Tage, gerechnet vom Beginn des Saugaktes an. Dem Saugakt kommt die entscheidende Bedeutung für den Beginn der Infektion zu. MONTGOMERY (1917) beobachtete z.B. bei einem Schaf klinische Erscheinungen erst 15 Tage, nachdem er es mit

infektiösen Zecken besetzt hatte. Bei iatrogenen Infektionen (mit Suspension aus infizierten Mäusegehirnen oder mit Verreibungsmaterial infizierter Zecken) schwankt die Inkubationszeit je nach verabreichter Dosis, dem Infektionsweg (i.v., i.m. oder s.c.), der Resistenz des einzelnen Tieres und der Virulenz des verwendeten Materials. Sie ist aber im allgemeinen kürzer als nach natürlicher Infektion. Bei 14 afrikanischen Schafen, die TERPSTRA (1969) mit der 4. oder 5. Mäusegehirnpassage des NSD-Virusstammes "Entebbe" i.v., s.c. oder i.m. mit unterschiedlichen Dosen ($10^{0,1}$ bis $10^{6,1}$ Mäuse LD_{50}) infizierte, schwankte die Inkubationszeit von 1 - 4 Tagen. Dagegen reagierten 19 afrikanische Schafe, die mit dem gleichen Virus nach einer zusätzlichen Zeckenpassage infiziert worden waren, nach 2 - 5 Tagen, 5 europäische Schafe erst nach 3 - 6 Tagen.

2.5.2. Klinische Erscheinungen

Der Beginn der klinischen Symptome ist durch einen meist steilen Fieberanstieg auf über 41°C gekennzeichnet. Die Körpertemperaturen bleiben 2 - 10 Tage lang auf Werten über 40°C (TERPSTRA 1969), manchmal ist die Fieberkurve auch 2-gipfelig (DAUBNEY und HUDSON 1931).

Bei afrikanischen Schafen, die TERPSTRA (1969) mit Mäusegehirnsuspension (s.o.) infiziert hatte, dauerte die Fieberreaktion 2 - 10 Tage, bei der mit in Zecken passiertem Virus (s.o.) infizierten Tiergruppe 1 - 6 Tage. Die Temperaturmaxima lagen im ersten Fall bei $40,4 - 42,2^{\circ}\text{C}$, im zweiten zwischen $40,5$ und $42,5^{\circ}\text{C}$. Bemerkenswert ist, daß mit Zeckenverreibung infizierte europäische Schafe (s.o.) im Schnitt mit höherem Fieber reagierten ($41,5 - 42,5^{\circ}\text{C}$).

Nach DAUBNEY und HUDSON (1931) fällt beim akuten und perakuten Krankheitsverlauf die Körpertemperatur um den 3. Tag nach Fieberbeginn plötzlich ab, und das Tier verendet bei perakutem Verlauf bereits nach einem, bei akutem nach ca. 4 weiteren Tagen. Zu ähnlichen

Beobachtungen kam TERPSTRA (1969). Danach starben 3 von 4 Tieren innerhalb 12 Stunden, das vierte innerhalb 24 Stunden nach dem raschen Fieberabfall. Elf weitere Tiere, bei denen die Temperatur langsamer zurückging, verendeten im Schnitt nach 2,8 Tagen.

Die Mortalitätsrate lag im ersten Fall bei 64 %, im zweiten bei 95 %.

Die klinischen Symptome sind des weiteren charakterisiert durch eine beschleunigte, zum Teil schmerzhaftes Atmung, schleimig-eitrigen Nasenausfluß, Konjunktivitis und Durchfall. Die Faeces sind hell- bis dunkelgrün, wässrig oder schleimig und stinkend, später eventuell mit relativ frisch erscheinendem Blut vermischt (DAUBNEY und HUDSON 1931, TERPSTRA 1969). Die Tiere verweigern die Futter- und Wasseraufnahme, sind teilnahmslos, haben fast ständig Kotdrang und sind oft nicht mehr in der Lage, sich zu erheben. Bei weiblichen Schafen erscheint die Schamgegend gerötet und geschwollen, tragende Tiere abortieren oft (DAUBNEY und HUDSON 1931).

Je nach Schwere der Erkrankung verenden die Tiere etwa 5 - 12 Tage p.i. bzw. 1 - 8 Tage nach Krankheitsbeginn (TERPSTRA 1969). Todesfälle nach längerer Erkrankung werden ebenfalls beobachtet, sind aber seltener. Überstehen die Tiere die Infektion, so ist eine längere Genesungszeit die Regel.

Nach EDELSTEN (1975) schwankt die Morbidität bei Schafen von 30 - 70 %, die Mortalitätsrate liegt bei 50 - 80 %. Bei Ziegen schätzte er die Mortalitätsrate auf 10 %. TERPSTRA (1969) fand hinsichtlich der Dauer der klinischen Symptome und der Mortalitätsrate bei iatrogen mit virushaltiger Zeckenverreibung infizierten Tieren und bei mit virushaltigen Zecken besetzten Schafen kaum Unterschiede. TERPSTRA (1969) fand, daß afrikanische und europäische Rassen gleich empfänglich für das MSD-Virus sind, daß jedoch bei europäischen Schafen die Fieberreaktion länger anhält, obwohl sie weniger starke Krank-

heitssymptome zeigten und öfter überlebten als einheimische Tiere. Damit werden die Befunde von MONTGOMERY (1917) bestätigt. Er fand bei Lokalrassen eine Mortalitätsrate von 71 % gegenüber 31 % in einer Gruppe europäischer und Kreuzungsschafe.

Die LD_{50} für Schafe ist exakt noch nicht bekannt, doch darf man nach TERPSTRA (1969) annehmen, daß sie weniger als eine Mäuse LD_{50} beträgt. Für die Virusisolierung ist daher nach Möglichkeit die s.c. Infektion von Schafen als die empfindlichere Methode der i.cer. Infektion von Mäusen vorzuziehen.

Bei Ziegen treten ähnliche, wenn auch weniger ausgeprägte Symptome auf, doch sind erhebliche Unterschiede festzustellen. So beobachtete TERPSTRA (1969) im West-Nile-Distrikt einen schweren Ausbruch von NSD bei afrikanischen Ziegen mit einer Mortalitätsrate von 80 - 88 %, während MONTGOMERY (1917) von 20 Angora-Kreuzungsziegen nur 2 letal infizieren konnte.

2.5.3. Veränderungen der Blutwerte

MUGERA und CHEMA (1967) stellten bei Merinoschafen, die am 6. Tag p.i. noch lebten, eine deutliche Erhöhung der Werte des Hämoglobins (Hb), des Hämatokrits (packed cell volume = P.C.V.), und der Erythrozytenzahlen sowie eine ausgeprägte Leukopenie fest. Bei Ziegen waren die Hb- und P.C.V.-Werte kaum verändert, doch sanken auch hier die Leukozytenzahlen um 48 - 59 %. Im Verlauf der Erkrankung ändern sich auch die Werte der Transaminasen. MUGERA und CHEMA (1967) fanden an den ersten zwei Tagen p.i. eine erhöhte Aktivität der SGOT und der SGPT. Während dann die Werte der SGOT in der Regel noch weiter anstiegen, zeigten die der SGPT unregelmäßigen Verlauf.

Einheimische afrikanische Schafe überlebten in ihren Versuchen nicht lange genug, um auswertbare Blutbefunde zu liefern.

2.5.4. Makroskopisch-anatomische Veränderungen

Das auffälligste äußerliche Merkmal bei an NSD verendeten Schafen sind die mit zum Teil blutigem Kot verschmutzten kaudalen Körperteile. Bei starken, länger anhaltenden Durchfällen sind die Kadaver abgemagert und dehydriert. Eine Konjunktivitis und Rhinitis führen oft zur Ansammlung trockener Krusten um die Augen und die Nasenöffnungen (TERPSTRA 1969). Am eröffneten Tierkörper findet man die stärksten Veränderungen im Magen-Darmtrakt. Im Labmagen besteht eine diffuse Blutfülle der Schleimhaut (DAUBNEY und HUDSON 1931, MUGERA und CHEMA 1967) oder Blutungen in deren Längsfalten (TERPSTRA 1969).

Im gesamten Dünndarm können Rötungen und Blutungen der Schleimhaut vorkommen, die nach kaudal stärker werden (DAUBNEY und HUDSON 1931, MUGERA und CHEMA 1967, TERPSTRA 1969). Die Autoren berichten, daß die ausgeprägtesten, längsverlaufenden, streifenförmigen Blutungen im Caecum zu finden sind, sie können bei schweren Verlaufsformen bis zum Colon und sogar Rektum reichen.

Der ganze Darmtrakt ist meist leer oder mit wenig flüssigem, oft blutigem und stinkendem Kot gefüllt. Alle Lymphknoten, vor allem aber die Mesenteriallymphknoten, sind vergrößert und auf der Schnittfläche feucht oder hyperämisch, und manchmal findet man Hämorrhagien (TERPSTRA 1969).

TERPSTRA fand die Schleimhäute der Nasenhöhlen gerötet sowie Schaum in der Trachea und den Bronchien. DAUBNEY und HUDSON (1931) sowie MUGERA und CHEMA (1967) beschrieben häufig eine Tracheitis und eine Blutfülle der Lungen.

Die Herzbeutelflüssigkeit ist meist nur geringgradig vermehrt. Epikardiale Blutungen sind nicht selten, häufiger sind jedoch endokardiale (DAUBNEY und HUDSON 1931, MUGERA und CHEMA 1967, TERPSTRA 1969).

Nieren und Blase zeigen ebenfalls häufig Blutungen. Besonders bei trächtigen Tieren ist das gesamte Genitale katarrhalisch entzündet. Bei den Foeten fallen ausge dehnte intra- und subkutane Blutungen auf (DAUBNEY und HUDSON 1931, TERPSTRA 1969). DAUBNEY und HUDSON fanden die Milz oft um das 5 - 6fache vergrößert. TERPSTRA (1969) und MUGERA und CHEMA (1967), die zwar auch bei einem hohen Prozentsatz der Fälle einen Tumor splenis diagnostizierten, konnten derartige Vergrößerungen jedoch nicht bestätigen.

Nach MUGERA und CHEMA (1967) zeigt das Zentralnervensystem eine Blutfülle im cortico-medullären Bereich. TERPSTRA (1969) beschrieb das Mark der großen Röhrenknochen als stark gelatinös und kirschfarbig verändert.

Bei Ziegen sind im allgemeinen die gleichen Veränderungen wie bei Schafen festzustellen, doch fällt auf, daß immer, wenn auch unterschiedlich stark, Hämorrhagien im Endokard zu finden sind, die sich bis in das Myokard ausdehnen (MUGERA und CHEMA 1967).

2.5.5. Pathologisch-histologische Veränderungen

Die erste Beschreibung der durch NSD-Virus verursachten pathologisch-histologischen Veränderungen gaben 1931 DAUBNEY und HUDSON, in neuerer Zeit MUGERA und CHEMA (1967). Nach den erstgenannten Autoren zeigen nur die Nieren deutliche und eventuell diagnostisch verwertbare Veränderungen in Form einer Glomerulo-Tubulo-Nephritis mit interstitiellen Hämorrhagien, die besonders im Mark auftreten. Im späteren Verlauf der Erkrankung finden sich in den Glomerulumschlingen vermehrt Leukozyten, und im Finalstadium sind die Tubuli dicht gepackt mit zellulärem und hyalinem Material. Die Zellkerne sind karyorrhektisch und im Mark treten starke interstitielle Blutungen auf. Die Glomerula erscheinen geschrumpft, ohne Struktur und hyalin (DAUBNEY und HUDSON 1931, MUGERA

und CHEMA 1967).

Im ganzen Dünndarm können Rötungen der Schleimhaut, selten Blutungen, zu finden sein. Im Caecum und Colon entstehen Hämorrhagien und Koagulationsnekrosen des Schleimhautepithels, dessen oberflächliche Schichten sich abschilfern.

In der Milz fällt eine starke Blutfülle im Sinus besonders auf, sowie eine Hyperplasie des Lymphoidgewebes mit Auftreten von Megakaryozyten (DAUBNEY und HUDSON 1931, MUGERA und CHEMA 1967).

Nach DAUBNEY und HUDSON (1931) sind die anderen Organe unauffällig, MUGERA und CHEMA (1967) fanden dagegen bei allen Schafen und Ziegen im Herz intermuskuläre Hämorrhagien und später hyaline Degeneration der Muskelfasern, die stellenweise nur noch in Fragmenten vorlagen.

In der Gallenblase bemerkten die Autoren Blutungen und Epitheldegenerationen, die sich zu einer Koagulationsnekrose der Gallenblasenschleimhaut mit Abstoßung des Grenzepithels entwickelten. Mittels Sudan IV-Färbung konnte eine zentrolobuläre fettige Degeneration der Leber nachgewiesen werden, die später in eine zentrolobuläre Koagulationsnekrose überging.

Generell bestehen in den meisten Organen Blutfülle und Hämorrhagien, so z.B. in den Nebennieren, dem Genitale, dem Atmungstrakt und der Großhirnrinde.

In Mäusen, die im Alter von 3 - 5 Tagen mit einer 5 %igen virushaltigen Mäusegehirnsuspension intracerebral infiziert worden waren, fanden MUGERA und CHEMA (1967) Verflüssigungsnekrosen und perivaskuläre Lymphozyteninfiltrate im Gehirn, eine hyaline Degeneration der Herzmuskelfasern, hyaline und zelluläre Niederschläge in den Tubuli der Nieren, eine Degeneration der Glomerula mit starken Lymphozyteninfiltraten im Rindenbereich und interstitiellen Hämorrhagien im Mark. Die Glomerulo-Tubulo-Nephritis ist bei späteren Stadien durch eine Koagulationsnekrose des

Tubulusepithels, Zellansammlungen in den Glomerulum-schlingen und interstitielle Blutungen charakterisiert: Auch hier kam es zu einer zentrolobulären fettigen Degeneration und Koagulationsnekrosen in der Leber, sowie zu pneumonischen Veränderungen der Lunge mit Zellinfiltraten aus Lymphozyten und neutrophilen Leukozyten.

2.5.6. Pathogenese

Die nach einer Infektion mit NSD-Virus ablaufenden pathogenetischen Vorgänge sind noch weitgehend unbekannt. Bewiesen sind bisher folgende Vorgänge: Das erste sichere Anzeichen einer angegangenen Infektion ist die schon nach 24 Stunden (oder später) auftretende Virämie. Sie dauert in der Regel 3 - 7 Tage, wobei es bei apparentem Krankheitsverlauf zu Fieber kommt. 24 Stunden nach dem Absinken der Körpertemperatur auf physiologische Werte kann kein Virus mehr aus dem Blut isoliert werden. Die Dauer der Virämie entspricht der Dauer der Fieberreaktion (DAUBNEY und HUDSON 1931, TERPSTRA 1969). Durch Zentrifugation von Zitratblut konnten DAUBNEY und HUDSON (1931) nachweisen, daß sowohl Plasma als auch korpuskuläre Bestandteile infektiös sind.

Nach den Untersuchungen von TERPSTRA (1969) sind bei akut erkrankten Schafen folgende Organe in absteigender Reihenfolge besonders virushaltig: Milz, Lunge, Mesenteriallymphknoten, Portallymphknoten, Mandibularlymphknoten. Auch die Leber und andere Lymphknoten waren in seinen Untersuchungen positiv, jedoch nicht so häufig. Bei subakutem Krankheitsverlauf fand der Autor Virus zu je einem Drittel der Fälle nur noch in den Nebennieren und der Milz und bei 10 % der Tiere in der Leber. Erstaunlicherweise konnte er in der Schleimhaut von Labmagen, Caecum und Colon kein Virus nachweisen. Diese Befunde wurden an Organen verendeter Schafe erhoben. MONTGOMERY (1917) infizierte zwei Tiere durch subkutane Injektion von Urin und mit Herzbeutelflüssigkeit.

2.5.7. Immunität

Schafe und Ziegen, die eine klinisch apparente Infektion mit NSD-Virus überstehen, sind gegen eine Reinfektion über mehrere Monate geschützt. Die genaue Dauer der nach einer natürlichen Ansteckung sich entwickelnden, belastbaren Immunität ist jedoch nicht bekannt (DAUBNEY und HUDSON 1931, TERPSTRA 1969).

MONTGOMERY (1917) beobachtete bei Merino-Kreuzungsschafen, die er drei Jahre zuvor experimentell infiziert hatte, nach subkutaner Gabe virushaltigen Schafblutes nur einen kurzen Temperaturanstieg.

Im Blut immuner Schafe und Ziegen lassen sich komplementbindende, präzipitierende und virusneutralisierende Antikörper nachweisen. JESSETT und Mitarbeiter (1976) konnten mit der indirekten Hämagglutination (IHA) Antikörpertiter in Schaf- und Ziegenserum nachweisen. Sie stellten außerdem fest, daß die mittels indirekter Immunofluoreszenz erhaltenen Ergebnisse eng mit den Resultaten aus der IHA korrelieren (vgl. 2.4.4.).

2.5.8. Prophylaxe und Bekämpfung

Für die Bekämpfung der NSD bieten sich zwei Möglichkeiten an:

- a) Maßnahmen gegen die Überträgerzecken,
- b) die Immunisierung gefährdeter Schaf- und Ziegenpopulationen.

a) In der Praxis ist es derzeit noch nicht oder nur in ganz speziellen Fällen möglich, die nicht auf Wirtstieren befindlichen Zeckenstadien erfolgreich mit Insektiziden zu bekämpfen. Mit virushaltigen Zecken verseuchte Weiden müssen über mindestens 2 1/2 Jahre als potentiell infektiös betrachtet werden (LEWIS 1946).

Eine regelmäßige Bekämpfung der auf Schafen und Ziegen

saugenden Zecken ist ebenfalls nur sehr selten gegeben. Hier sind es überwiegend finanzielle und technische Schwierigkeiten, die von den Farmern der endemisch verseuchten Gebiete nicht überwunden werden können, um mittels Dip- oder Sprayverfahren eine effektive Zeckenbekämpfung durchzuführen.

b) Immunisierung

Die ersten Versuche, Schafe gegen NSD zu immunisieren, unternahm 1917 MONTGOMERY. Doch weder mit Hyperimmunscharum allein, noch mit einer Simultanimpfung (Immunscharum und Naturvirus), oder mittels wiederholter Virusinokulationen nach Serungaben erzielte er gute Ergebnisse. Auch WALKER (1932, zit. bei TERPSTRA 1969), der eine Formolvakzine und DAUBNEY (1944, zit. bei TERPSTRA 1969), der eine Kristallviolettvakzine herstellte, hatten nicht mehr Erfolg. DAVIES und Mitarbeiter versuchten 1974 erneut, eine inaktivierte NSD-Vakzine herzustellen. Die Autoren fällten virushaltige Gewebekulturflüssigkeit (50. - 55. NSD-Viruspassage in BHK 21/13-Zellen) mit Methanol aus und stellten daraus eine 10 %ige Suspension in PBS (phosphat buffered saline) und Lämmerscharum her, die sie zu gleichen Teilen mit Freund's inkomplettem Adjuvans mischten. 10 Corriedale-Schafe erhielten subkutan 2 Dosen (2,5 ml Viruspräzipitat + 2,5 ml Adjuvans) dieses Impfstoffes in 3-wöchigem Abstand injiziert und wurden 6 Wochen später mit 10 000 Mäuse LD₅₀ eines virulenten Feldvirus belastet. Acht der Tiere zeigten keine klinisch erfaßbare Reaktion auf die Challengeinfektion, wenn auch aus einem Schaf am 4. Tag nach der Belastung Virus isoliert werden konnte. Die beiden anderen Schafe reagierten mit einem virämischen Fieber, beschleunigter Atmung und einem Abfall der Leukozyten um ca. 40 %. Eine Verabreichung höherer Impfstoffdosen konnte das Ergebnis nicht verbessern. Die Schwierigkeit, einen zugleich wirksamen und unschädlichen Totimpfstoff herzustellen, war offensichtlich nicht überwunden.

Es ist verständlich, daß man auch attenuierte Impfstoffe herzustellen versuchte. ANSELL (1957) attenuierte NSD-Virus aus der Milz eines erkrankten Schafes (Stamm Muguga-Hyslop) über 22 bzw. 25 - 42 Passagen im Gehirn adulter Mäuse. Zwei Schafe vertrugen die Impfung reaktionslos und waren gegen eine Belastungsinfektion immun. Interessant ist, daß aus dem Blut solcher Schafe, die mit der 32. Mäusegehirnpassage infiziert worden waren, am 4. Tag p.vac. noch Virus isoliert werden konnte. MAC OWEN (1960 und 1961, zit. bei TERPSTRA 1969) gelang es jedoch nicht, mit demselben Virusstamm eine Immunität zu erzielen.

WEINBREN (1958/59) passierte einen NSD-Virusstamm 110 mal in Mäusegehirnen und erzielte damit angeblich bei Schafen eine gute Immunität. Mit der 112. Passage des gleichen Stammes erreichten SIMPSON et al (1962/63) jedoch weniger befriedigende Ergebnisse. Nach TERPSTRA (1964/65, zit. bei HOWARTH und TERPSTRA 1965) entwickeln Ziegen nach Impfung mit diesem Virusmaterial nur schwache klinische Symptome, während Schafe mit hohem Fieber ($42,2^{\circ}\text{C}$), Abort und starkem Durchfall reagierten. Der Autor versuchte 1969, durch weitere Passagen in Mäusegehirnen eine stärkere Attenuierung des NSD-Virusstammes "Entebbe" zu erreichen. Mit der 114. Passage induzierte er bei 50 % damit geimpfter afrikanischer Schafe noch starke klinische Reaktionen. Eine 6 Monate später durchgeführte Belastungsinfektion mit $10^{5,3}$ Mäuse LD_{50} zeigte, daß fast alle Schafe keine belastbare Immunität erworben hatten. Im Gegensatz dazu reagierten Ziegen nach einer Applikation der 115. Mäusegehirnpassage nur mit milden Impfreaktionen, entwickelten aber eine belastbare und dauerhafte Immunität. Bei Schafen kam es 2 - 3 Wochen p.vac. zur Bildung komplementbindender und innerhalb von 13 Tagen zum Auftreten präzipitierender Antikörper. Mit der 136., 141., 150. und 165. Mäusegehirnpassage erzielte der Autor bei afrikanischen und europäischen Schafen angeblich noch bessere

Ergebnisse. Der Impfstoffstamm hatte noch mehr an Virulenz verloren, so daß nur selten schwache Impfreaktionen auftraten. Trotzdem wurde eine Belastungsinfektion 4 Monate p.vac. von allen Tieren symptomlos vertragen. Auch über Zellkulturpassagen versuchte man eine Attenuierung des NSD-Virus zu erzielen. Ein 12 mal in Ziegen nieren - und zusätzlich 8 mal in Hamsternierenzellkulturen passiertes NSD-Virus hatte nach HOWARTH und TERPSTRA (1965) noch nicht seine Virulenz verloren. TERPSTRA (1969) passierte das Virus weiter in BHK 21/13-Zellen. Erst ab der 55. BHK-Passage zeigten die Schafe p.vac. nur noch milde Fieberreaktionen. Die 71. Passage wurde reaktionslos vertragen. Bei der Belastungsinfektion 1 bzw. 6 Monate später entwickelten 1/3 der geimpften Schafe noch Fieber, jedoch keine sonstigen Symptome. Bei einem Tier konnte während der Fieberphase jedoch Virus aus dem Blut isoliert werden. TERPSTRA glaubt, daß das Virus zwischen der 62. und 71. Passage seine Virulenz praktisch verliert, allerdings sinkt dabei seine immunogene Qualität stark ab.

Epidemiologisch bedeutsam ist die Frage, ob attenuiertes Virus eine Virämie verursacht und deshalb von Zecken aufgenommen, weiter verschleppt und eventuell wieder virulent werden kann.

Nach WEINBREN (1959) war der NSD-Virusstamm "Entebbe" nach Verimpfung der 110. Mäusegehirnpassage auf Schafe nicht mehr von Zecken auf andere Schafe übertragbar. TERPSTRA (1969) prüfte die 136. Mäusegehirnpassage dieses Stammes ebenfalls ohne Erfolg. Er vermutete, daß dieses Virus seine Fähigkeit verloren habe, sich in der Zecke zu vermehren. Die 46. und die 60. Zellkulturpassage wurde jedoch von Zecken nach deren Häutung auf empfängliche Schafe übertragen. Diese Schaf-Zecken-Schaf-Passage brachte jedoch keine Erhöhung der Virulenz. Trotzdem ist nicht auszuschließen, daß mehrere solcher Zyklen doch zu einer Virulenzsteigerung führen könnten. DAVIES und Mitarbeiter (1974)

wiesen ausdrücklich darauf hin, daß Angaben über die Wirksamkeit von NSD-Impfstoffen nur in Bezug auf die Tierart (Schaf oder Ziege) bzw. -rasse Gültigkeit haben können.

2.5.9. Diagnose

Die Diagnose "Nairobi Sheep Disease" läßt sich in Endemiegebieten mit einiger Sicherheit aufgrund des klinischen Bildes und der makroskopisch-anatomischen Veränderungen stellen. Auch epidemiologische Eigenarten der Seuche wie Morbidität und Mortalität bei afrikanischen bzw. europäischen Schafen und Ziegen können Hinweise geben. Durch Nachweis und Identifikation der Hauptvektoren *Rhipicephalus appendiculatus*, *R. pulchellus* und *Amblyomma variegatum* werden Verdachtsmomente weiter erhärtet.

Häufig sind jedoch das klinische Bild und die pathologischen Veränderungen nicht so charakteristisch, daß sie eine eindeutige Diagnose erlauben. Dann empfiehlt es sich nach MUGERA und CHEMA (1967) Niere, Gallenblase, Leber und Herzmuskel histologisch zu untersuchen (vgl. 2.5.5.).

Die serologische Diagnose einer NSD-Infektion ist am sichersten durch den Nachweis virusneutralisierender und präzipitierender Antikörper (etwa ab dem 8. Tag p.i. bzw. 1 - 2 Tage nach Ende der Virämie nachweisbar) bzw. durch die Immunofluoreszenz möglich. Mit der direkten Immunofluoreszenz unter Verwendung von Schafhyperimmunserum konnten OHLER und Mitarbeiter (1970) schon ab 18 Stunden p.i. in BHK 21/13-Zellen eine spezifische Fluoreszenz feststellen. JESSETT und Mitarbeiter (1976) wiesen mit dem indirekten Fluoreszenztest Antikörper gegen das NSD-Virus nach.

In der Regel hat man alle diese Verfahren bisher überwiegend für experimentelle Untersuchungen oder epidemiologische Erhebungen eingesetzt.

Dem Erregernachweis kommt selbstverständlich das Hauptgewicht zu. Im Tierversuch gelingt dies

am sichersten durch Inokulation virushaltigen Materials (virämisches Blut oder Serum, Milzsuspension etc.) in empfängliche Schafe. Sie stellen das empfindlichste Wirtssystem dar. Aus Kosten- und arbeitstechnischen Gründen wird man jedoch meist auf infantile Mäuse zurückgreifen, die sich i.cer. und/oder i.p. infizieren lassen.

In beimpften Zellkulturen (sekundäre Ziegen-, Schaf- und Hamsternierenzellkulturen, BHK 21/13-Zellen) sind charakteristische Einschlusskörperchen sichtbar, ein z.p.E. tritt je nach Virusstamm und Art der Zellkultur zu unterschiedlichen Zeiten p.i. auf (COACKLEY und PINI 1965). HOWARTH und TERPSTRA (1965) konnten während 8 Passagen in Ziegenhodenkulturen keinen und in Ziegennierenzellen erst in der 6. Passage einen z.p.E. feststellen, so daß eventuell Blindpassagen nötig sind. Steht ein Hyperimmunserum (z.B. aus Schafen oder Kaninchen) zur Verfügung, kann NSD-Antigen (aus Milzverreibungen erkrankter Schafe oder aus infiziertem BHK-Zellkulturmaterial) auch durch die Ausbildung entsprechender Banden im Agar-Gel-Diffusionstest nachgewiesen werden (TERPSTRA 1969). Im Feld wird die Diagnose oft durch lokale Umstände und traditionsgebundene Gebräuche erschwert.

2.5.10. Differentialdiagnosen

Differentialdiagnostisch kommen vor allem Infektionen in Betracht, die von Durchfällen und hämorrhagischen Veränderungen begleitet sind. Demnach ist in erster Linie an Herzwasser (DAUBNEY und HUDSON 1931), aber auch an Babesiosen (EDELSTEN 1975), Rift-Valley-Fieber, Pest der kleinen Wiederkäuer, Kokzidiose, Pasteurellose sowie an Schwermetall- und Pflanzenvergiftungen zu denken (TERPSTRA 1969). Herzwasser muß vermutet werden, wenn Amblyomma variegatum-Zecken vorkommen.

Die Pest der kleinen Wiederkäuer, eine Rinderpestvirusinfektion, kann eine der NSD sehr ähnliche Symptomatik zeigen,

doch ist das Auftreten der Krankheit nicht an übertragende Zecken gebunden und virologisch-serologisch sowie histologisch von NSD differenzierbar.

Die Rift-Valley-Fieber-Virus-Infektion wird durch Stechfliegen übertragen. Die gastro-intestinalen Läsionen können denen von NSD ähneln, doch erlauben virologische, klinische und epidemiologische Charakteristika eine Abgrenzung. Die anderen genannten Krankheiten sind notfalls bakteriologisch bzw. parasitologisch bzw. toxikologisch abzuklären.

3. Material und Methoden

3.1. Virusstämme

Alle Virusstämme stellte das Veterinary Research Laboratory Kabete, Kenya zur Verfügung¹⁾. Die Untersuchungen wurden mit folgenden Virusstämmen durchgeführt:

NSD 045: Es handelt sich um einen Virusstamm, der aus einem nahe Nairobi erkrankten Wollschaf über 2 Baby-mausgehirnpassagen isoliert und dann einmal in BHK (baby hamster kidney)-Zellen passiert worden war. Er lag in gefriergetrockneter Form vor und war als NSD 045 MBII BHK 1 bezeichnet.

NSD I 105: Der Feldstamm war als gefriergetrocknete 2. Baby-mausgehirnpassage geliefert worden.

3.2. Zellkulturen

3.2.1. Säugetierzellen

3.2.1.1. Subkulturen

Zur Virusanzüchtung und -vermehrung verwendeten wir Sekundär- und Tertiärkulturen von Hamster- und Schafnierzellen. Die Hamsternieren entnahmen wir jeweils ca. 6 Wochen alten Tieren, die Schafnieren entstammten ca. 3 - 4 Monate alten Schlachttieren. Das Anlegen der Primärkulturen erfolgte nach üblicher Weise. Zur Anzucht und zur Erhaltung verwendeten wir Medium 199 mit 10 % foetalem Kälberserum (fKS). Die Bebrütungstemperatur betrug 37°C. Nach Einsaat von 300 - 500 000 Zellen/ml wurden dicht gewachsene Primärkulturen aus Schafnieren etwa am 3. Tag mit Trypsin abgedaut und in konzentrierter Form (15 ml pro Rouxschale) in 60 % Wachstumsmedium, 30 % f.KS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) bei -80°C eingefroren. Nach

1) Wir danken Dr. DAVIES für die freundliche Überlassung der Virusstämme.

Bedarf wurden einige Ampullen aufgetaut und Sekundärkulturen daraus angelegt, indem wir die Zellsuspension 1:40 mit M 199 verdünnten. Nach 3 - 4 Tagen legten wir Subkulturen nach abermaligem Verdünnen der Zellen im Verhältnis 1:3 an.

Sekundäre Hamsternieren-Zellkulturen stellten wir direkt aus dichtgewachsenen Primärkulturen (Zelleinsaat 400 - 500 000/ml) nach Trypsinabtauung und Resuspension im Verhältnis 1:3 in Anzuchtmedium her.

Zur Virusvermehrung züchteten wir die Zellen in Plastikschalen (75 cm², Fa. Falcon), in Vierkant- und Breed-Demeterflaschen oder Rouxschalen. Plastikschalen erhielten 40 ml, Vierkantflaschen 20 ml und Rouxschalen 100 ml Medium.

3.2.1.2. Zelllinien

Babyhamsternierenzelllinie BHK 13 (Fa. Seromed GmbH München):²⁾

Diese Zellen züchteten wir ebenfalls in den genannten Kulturgefäßen unter Verwendung von Eagle's Medium (Modifikation nach Dulbecco) mit einem Zusatz von 10 % f.KS und 10 % Tryptosephosphatbouillon. Da die Zellen mit diesem Medium bei 37°C schon nach wenigen Tagen zu degenerieren begannen, gingen wir dazu über, sie bei 28°C mit M 199 und einem Zusatz von 10 % f.KS zu halten. Auf diese Weise konnte der dichte Zellrasen über mindestens 14 Tage gehalten werden. Die Zelllinie wurde regelmäßig auf Freisein von Mykoplasmen untersucht.³⁾

- 2) Wir danken Herrn Dr. Jentsch für die Überlassung der Zelllinie BHK 13.
- 3) Wir danken Frau Prof. Dr. Gylstorff (Klinik für Innere Krankheiten der Tiere, Lehrstuhl für Krankheiten des Geflügels, der Wild- und Ziervögel der Universität München) für die Durchführung der Kontrolluntersuchungen.

Astrozytenzelllinie C₆:

Bei der Zelllinie C₆⁴⁾ handelt es sich um eine Astrozytenzelllinie, die von einer Labormaus abstammt. Die Zellen wurden bei 37°C in Eagle's Medium mit 10 % f.KS auf Vierkantkolben vermehrt und zur Viruszüchtung unter Eagle's MEM mit 2 % f.KS bei 28°C gehalten.

Verozelllinie der Fa. Flow Laboratories, Bonn:

Es handelt sich hierbei um Nierenzellen, die von einer ostafrikanischen grünen Meerkatze abstammen. Sie wurden bei 37°C bebrütet und in Medium 199 mit 10 % f.KS auf Vierkantflaschen vermehrt.

Die Zelllinie 3T6 der Fa. Flow Laboratories, Bonn:

Dies sind Fibroblastenzellen aus einer Maus. Wir züchteten die Zellen bei 37°C in Eagle's Medium (Modifikation nach Dulbecco), das 10 % f.KS enthielt.

Vero- und 3T6-Zellen bildeten nach ca. 2 - 3 Tagen einen dichten Zellrasen. Sie wurden dann unter Erhaltungsmedium gesetzt, das aus Eagle's MEM mit 2 % f.KS bestand. Die Zellen hielten sich unter diesem Medium bei 37°C mindestens 2 Wochen lang ohne sich abzulösen.

Für Zellpassagen wurden dicht gewachsene Kulturen mit 0,25 %igem PBST bedeckt, das wir etwa eine Minute einwirken ließen und dann wieder absaugten. Die feuchten Zellrasen wurden dann ca. 5 Minuten bei 37°C gelagert und schließlich mit Wachstumsmedium von der Gefäßwand abgespritzt. Die abgelösten Zellen wurden nun in der gewünschten Menge Wachstumsmedium suspendiert. Auf diese Weise erspart man sich ein Zentrifugieren der in PBST schwimmenden Zellen. Wir haben keine Nachteile im Wachstum der nach

- 4) Wir danken Herrn Priv. Doz. Dr. Stavrou (Institut für Tierpathologie, Lehrstuhl für allgemeine Pathologie und Neuropathologie der Universität München (Vorstand Prof. Dr. Dahme und Prof. Dr. von Sandersleben) für die Überlassung dieser Zelllinie.

obiger Methode behandelten Zellen feststellen können. Die Vermehrungsraten betrugen für Verozellen 1:5 - 6 und für 3T6-Zellen 1:6 - 7. BHK 13- und C₆-Zellen teilten wir bei Passagen im Verhältnis 1:6 und erhielten auch hier nach 2 Tagen erneut einen dichten Zellrasen. Die primären Hamster- und Schafnierenzellkulturen wurden 1:3 vermehrt und bildeten nach ca. 3 Tagen eine konfluierende Zellschicht.

C₆-Zellen sind rundlich, granuliert, lichtbrechend und liegen im lockeren Verbänd. Manche Zellen bilden dünne lange Ausläufer bis weit in benachbarte Zellbezirke hinein.

3.2.2. Arthropodenzellen

3.2.2.1. Aedes-Zelllinien

Die Zelllinien "Aedes albopictus"⁵⁾ und "Aedes aegypti"⁶⁾ wurden auf ihre Eignung getestet, NSD-Virus vermehren zu können. Als Anzuchtmedium diente Mitsuhashi-Maramorosch (MM-)-Medium (1964) mit 10 % f.KS, das nach dem Dichtwachsen des Zellrasens nicht gewechselt wurde. Die Zellen wurden ständig bei 28°C gehalten und durch bloßes mechanisches Abspritzen (ohne vorherige Trypsinandauung) zur Vermehrung 1:5 in frischem MM-Medium suspendiert.

Aedes aegypti-Zellen sind rundlich oder ellipsoid bis spindelförmig und liegen scheinbar ohne Verbindung nebeneinander. Mehrschichtige Zellhaufen wechseln mit dünner bewachsenen Stellen.

Die Zellen der Linie Aedes albopictus sind etwas größer als A. aegypti-Zellen, ebenfalls rundlich, stark granuliert und lichtbrechend. Auch sie liegen anscheinend verbindungslos nebeneinander, bilden aber einen gleichmäßigeren Zellrasen als A. aegypti-Zellen.

5) Für die Überlassung der Zelllinie Aedes albopictus danken wir Herrn Dr. Jentsch, Fa. Seromed GmbH, München.

6) Wir danken Herrn Prof. Dr.Dr.h.c. Mayr (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektionsmedizin und Seuchen des Fachbereiches Tiermedizin der Universität München) für die Überlassung der Zelllinie "Aedes aegypti".

3.2.2.2. Rhipicephalus appendiculatus-Zellen

Bei der Zelllinie TTC-243 (VARMA et al 1975) handelt es sich um Zellen, die von *R. appendiculatus*-Zecken (kurz vor der Häutung zu Adulten gewonnen) abstammen.⁷⁾ Als Vermehrungs- und Haltungsmedium dient Leibovitz L-15-Medium (LEIBOVITZ 1963) mit 10 % inaktiviertem f.KS und 10 % Tryptosephosphatbouillon. Die Zellen wachsen nur dann zu einem dichten Rasen aus, wenn bestimmte Bedingungen eingehalten werden (VARMA et al 1975).

Wir verwendeten 250 ml-Arzneiflaschen und 25cm²-Plastikschalen (Fa. Falcon), die wir jeweils mit 20 ml bzw. 15 ml einer Zellsuspension beschickten.

Die TTC-243-Zellen sind rundlich bis polygonal, sie bilden aber zum Teil spindelförmige Ausläufer. Die Zellen vermehren sich nicht zu einem absolut homogenen und dicht geschlossenen Zellrasen. Vielmehr beobachtet man eher einen relativ lockeren Zellverband, der nicht so fest an der Wand der Kulturgefäße haftet, wie bei Warmblüterzellen.

Konfluierende Zellrasen werden nach etwa 8 - 10 Tagen erhalten und dann im Verhältnis 1:2 oder 2:3 weiter passiert. Dazu wird das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit frischem von der Wand des Wachstumsgefäßes abgeschüttelt. Falls sie in größeren Klumpen zusammenhaften, werden sie mehrmals auf- und abpipettiert.

3.3. Versuchstiere

3.3.1. Mäuse

Die verwendeten infantilen Albinomäuse (1 - 4 Tage alt) entstammten der nach konventionellen Methoden gehaltenen institutseigenen Zucht. Sie wurden in Makrolonkäfigen (ein Wurf pro Käfig) gehalten und mit Fertigpreßfutter

7) Wir danken Frau Dr. Mary Pudney, London School of Hygiene and Tropical Medicine, für die Überlassung der Zellen.

(Pellets) der Fa. Altromin gefüttert. Wasser erhielten sie ad libitum.

3.3.2. Schafe

Sie wurden von einem Zuchtbetrieb in der Nähe Münchens bezogen. Zur Verwendung kamen männliche und weibliche Tiere der Rassen "Deutsches Schwarzköpfiges Fleischschaf" bzw. "Merinolandschaf". Die Tiere waren ca. 3 1/2 Monate alt, ihr Durchschnittsgewicht betrug 35 kg. Zwei Tiere waren jeweils in einer Isolierbox untergebracht. Sie wurden mit Heu gefüttert. Wasser stand ad lib. zur Verfügung. Die Infektionsversuche führten wir unter strengen Isolierungsmaßnahmen durch: Die Jauche wurde desinfiziert, aller Dung unschädlich beseitigt, ein Kleiderwechsel beim Betreten des Isolierstalles, d.h. also stets für die Pflege oder Untersuchung der Tiere, wurde vorgenommen.

Nach Beendigung der jeweiligen Versuchsserien, d.h. nach dem Tod der Tiere, wurden die Kadaver unschädlich beseitigt und eine Schlußdesinfektion nach veterinärpolizeilichen Vorschriften durchgeführt.

3.3.3. Zecken

In einem Vorversuch wurden Larven, Nymphen und Adulte von *Rhipicephalus appendiculatus* aus institutseigener Zucht auf infizierte Schafe angesetzt. Wir setzten die Zecken einen Tag vor oder gleichzeitig mit der Infektion am Ohr der Schafe an. Ein am Ohrgrund direkt aufgeklebter Leinensack verhinderte das Entweichen der Zecken. Wir kontrollierten täglich, ob Zecken abgefallen waren. Diese wurden gesammelt und entweder virologisch untersucht oder bei 28°C gehalten, damit die weitere Entwicklung vonstatten gehen konnte (Eiablage, bzw. Umwandlung in ein anderes Stadium).

3.4. Histologische Untersuchungen

3.4.1. Histologische Untersuchung von Säugetierorganen

Die histologischen Untersuchungen von Gehirnen infizierter Saugmäuse und Organproben der Schafe wurden im Institut für Tierpathologie des Fachbereiches Tiermedizin der Universität München (Vorstand Prof. Dr. Dahme und Prof. Dr. von Sandersleben)⁸⁾ vorgenommen.

Organproben, die wir den Schafen bei der Sektion entnommen hatten und Gehirne moribund getöteter Saugmäuse wurden dazu zuvor in 9 %igem Formalin fixiert.

3.4.2. Einschlusskörperchenfärbung

Zur Darstellung intrazytoplasmatischer Einschlusskörperchen züchteten wir Zellen (Schafnieren, C₆) auf Deckglasstreifen in Leighton-Röhrchen. Die dichten Zellrasen wurden mit 2 ml pro Röhrchen einer Virussuspension (Virusstamm 045 oder I 105) im entsprechenden Erhaltungsmedium beschickt und 3 Stunden bei 37°C bebrütet. Danach wurde das Animpfmateriäl abgesaugt und frisches Erhaltungsmedium (je 2 ml) auf die Röhrchen verteilt. Die weitere Bebrütung erfolgte bei Schafnierenzellkulturen bei 37°C, bei der Zelllinie bei 28°C. Als Kontrollen dienten jeweils eine Anzahl unbeimpfter Röhrchen.

Vom 1. bis zum 8. Tag p.i. wurde täglich eine Deckglaskultur jedes Virusstammes sowie eine unbeimpfte Kontrolle nach Bouin fixiert und dann mit 70 %igem Äthylalkohol gewaschen. Die Färbung der Zellen wurde mit Hämatoxylin und Phloxin durchgeführt und die luftgetrockneten Deckglasstreifen mit Eukitt (Fa. O. Kindler, Freiburg) auf Objektträger aufgeklebt.

8) Wir danken Prof. Dr. Dahme und Prof. Dr. v. Sandersleben für die Durchführung der Untersuchungen.

3.5. Züchtung des NSD-Virus in Zellkulturen

3.5.1. Züchtung in Hamster- und Schafnierenzellen

Die Infektion aller Zellkulturen erfolgte nach der Adsorptionsmethode. Dabei wurde von dichtgewachsenen Zellrasen das Wachstumsmedium entfernt und dann soviel Erhaltungsmedium dazugegeben, daß es zusammen mit der hinzugefügten Virussuspension (i.d.R. 5 ml) die Hälfte der üblichen Mediummenge ergab (bei Vierkantflaschen also 10 ml, bei Plastikschalen 20 ml, bei Rouxschalen 50 ml). Nach 3-stündiger Bebrütung bei 37°C wurde das Animpfmaterial (Zellfragmente plus Überstand) abgesaugt, der Zellrasen einmal vorsichtig mit Erhaltungsmedium gewaschen und schließlich die volle Menge Erhaltungsmedium zugegeben.

Die Hamster- und Schafnierenzellkulturen wurden, unabhängig davon, ob es zu zytopathischen Veränderungen gekommen war oder nicht, etwa 7 - 10 Tage lang bei 37°C belassen und dann eingefroren. Nach kurzem Antauen wurden Zellrasen und Medium in noch gefrorenem Zustand von der Wand des Kulturgefäßes abgeschüttelt und aufgetaut. Ein Teil dieser Suspension wurde ohne Abzentrifugieren für die nächste Viruspassage verwendet und der Rest bei -80°C eingefroren.

In den Hamster- und Schafnierenzellkulturen züchteten wir den NSD-Virusstamm 045, der zuvor 2 mal in Schafen und 6 bzw. 7 mal in BHK 13-Zellen passiert worden war, und den Stamm I 105 nach dessen erster Schafpassage.

3.5.2. Züchtung des NSD-Virus in Zelllinien

3.5.2.1. Züchtung in den Zelllinien BHK 13 und C₆

Auch zur Infektion dieser beiden Zelllinien wurde die Adsorptionsmethode, wie unter 3.5.1. beschrieben,

angewandt. Nach dem Mediumwechsel 3 Stunden p.i. wurden die infizierten Zellkulturen jedoch in den 28°C-Brutschrank überführt, um ein vorzeitiges Degenerieren des Zellrasens zu verhindern. Viruspassagen wurden wie oben angegeben ebenfalls nach 7 - 10 Tagen durchgeführt.

Die Zelllinie BHK 13 wurde mit dem NSD-Virusstamm 045 nach dessen 1., 2. und 4. Schafpassage und einer Mäusegehirnpassage, mit dem Stamm I 105 (Originalmaterial) nach einer Schafpassage beimpft. Nach 2 Schaf- und 10 weiteren BHK 13-Passagen (zur Infektion diente virushaltiges Schafserum, das am 5. Tag p.i. gewonnen wurde) gaben wir den Stamm 045 auf C₆-Zellen, den Stamm I 105 schon nach zwei BHK 13-Passagen.

3.5.2.2. Züchtung in den Zelllinien 3T6 und Vero

Die Zelllinien 3T6 und Vero wurden nach der Inokulation von Virusmaterial genau wie sekundäre Hamster- und Schafnierenzellkulturen behandelt. Auch die Durchführung der Viruspassagen erfolgte nach der dort angegebenen Methode. Beide Zellarten wurden mit dem Stamm 045 aus Serum des Schafes C vom 4. Tag p.i. infiziert.

3.5.2.3. Züchtung des NSD-Virus in Arthropodenzellen

Auch die Zelllinien "Aedes albopictus" und "Aedes aegypti" wurden nach der Adsorptionsmethode beimpft. Die Virusadsorption und die weitere Bebrütung wurden jedoch bei 28°C durchgeführt, und Viruspassagen legten wir wie unter 3.5.1. angegeben an.

Versuche, das NSD-Virus in diesen Zellen zu züchten, erfolgten mit dem Virusstamm 045, der eine bzw. zwei Schafpassagen durchlaufen hatte.

Die Zeckenzelllinie TTC-243 wurde mit dem Virusstamm 045 (26. BHK 13-Passage nach 2 Schafpassagen) beimpft. Das Zellkulturmaterial wurde 5 Minuten bei 2000 UpM zentri-

fugiert und 2 ml des Überstandes ($10^{6,5}$ Mäuse LD_{50}) ohne vorhergehenden Mediumwechsel zu der Zeckenzellkultur gegeben. Nach 3-stündiger Adsorptionszeit bei $28^{\circ}C$ wurde das Gemisch aus Animpfmateriel und Zeckenzellkultur-überstand vorsichtig abgesaugt, der Zellrasen 1 mal gewaschen und frisches Zellkulturmedium zugefügt. Jeweils am 4., 6. und 12. Tag p.i. wurde der Kulturüberstand abgesaugt, ein Teil bei $-80^{\circ}C$ eingefroren und ein weiterer in den Verdünnungen 10^{-1} bis 10^{-5} auf Babymäuse verimpft. Als Kontrolle dienten Babymäuse, die unverdünnten Kulturüberstand einer nicht-infizierten Zeckenzellkultur i.cer. erhielten.

Am 17. Tag p.i. legten wir mit Kulturüberstand eine Viruspassage an und infizierten gleichzeitig Babymäuse.

3.5.2.4. Titration von Virusmaterial

3.5.2.4.1. Titration in Babymäusen

Zur Titerbestimmung des Originalmaterials, von Zellkulturen, Schafseren und Mäusegehirn- oder Zeckenverreibungen legten wir Verdünnungsreihen in 10er Potenzen an ($10^0 - 10^{-7}$). Als Verdünnungsflüssigkeit diente bei Zellkulturmaterial das entsprechende Erhaltungsmedium oder PBS, bei Gehirn- und Zeckenverreibungen antibiotikahaltige PBS-Lösung. Bei Schafseren sowie Originalmaterial verwendeten wir Yeast-Medium ohne KS. Gehirne infizierter Saugmäuse und Zecken wurden gewogen und eine 10 Vol.-%ige Suspension daraus hergestellt, die als Verdünnungsstufe 10^{-1} gerechnet wurde.

Pro Verdünnungsstufe erhielten 4 - 6 Babymäuse 0,02 ml intracerebral. Als Kontrolle diente eine entsprechende Anzahl von Babymäusen, die nur Verdünnungsflüssigkeit, nicht-infektiöse Gehirn- oder Zeckensuspension bzw. 1:10 verdünntes Normalserum injiziert bekommen hatten. Die Titerberechnung erfolgte nach der Methode von REED und MUENCH (1938), die Titerwerte sind in LD_{50}/ml angegeben.

3.6. Die Infektion von Säugetieren mit NSD-Virus

3.6.1. Infektion von Saugmäusen

Die Infektion 1 - 4 Tage alter Babymäuse hatte folgende Ziele:

- a) den Nachweis von NSD-Virus in verschiedenen Materialien (Zellkulturmaterial, Schafseren, Organ- und Zeckenverreibungen)
- b) die Titration des Virusgehaltes von Schafseren oder Zellkulturmaterial
- c) die Durchführung von NSD-Virus-Mäusegehirnpassagen.

Die Saugmäuse wurden intracerebral (i.cer.) mit 0,02 ml und/oder intraperitoneal (i.p.) mit 0,1 ml infiziert. Um zu prüfen, ob in einem zu untersuchenden Material überhaupt NSD-Virus vorhanden war, wurden die Saugmäuse sowohl i.cer. als auch i.p. infiziert. Zur Virustitration und für die Mäusegehirnpassagen wurden die Tiere nur i.cer. infiziert. Da die Würfe in der Regel 12 Babymäuse umfaßten, war es möglich, jeweils 3 Verdünnungsstufen zu verimpfen, wobei die infizierten Tiere beim Muttertier bleiben konnten. Die Würfe wurden täglich kontrolliert. Als spezifisch an NSD gestorben wurden die ab dem 2. Tag p.i. auftretenden Todesfälle gewertet. Die Beobachtungszeit lief bis zum 21. Tag p.i.. Mäuse, die dann noch lebten, galten als nicht infiziert und wurden zur Bestimmung der LD₅₀-Werte als negativ gerechnet.

Von moribunden Saugmäusen bestimmter Passagen ernteten wir die Gehirne unter antiseptischen Bedingungen. Sie wurden 1:10 in antibiotikahaltigem PBS homogenisiert und bei 2000 UpM 2 Minuten abzentrifugiert. Die Überstände dienten als Ausgangsmaterial für Mäuse- bzw. Zellkulturpassagen und zur Infektion eines Schafes.

3.6.2. Infektion von Schafen mit NSD-Virus

3.6.2.1. Klinisch-chemische Untersuchungen

Allen Schafen wurde vor der Infektion Blut abgenommen und mehrmals die Temperatur gemessen. Tägliche Blutabnahmen erfolgten ab dem 1. Tag p.i.. Zur Erstellung von Differentialblutbildern fingen wir einen Teil des aus der Vena jugularis entnommenen Blutes in EDTA-Röhrchen (Fa. Greiner, Nürtingen) auf.

Serumproben gewannen wir durch Zentrifugieren der restlichen Blutmenge. Das Serum wurde in Portionen zu 4 ml in Plastik- oder Glasröhrchen gefüllt und bei -80°C gelagert. Davon wurden Proben sowohl zur Bestimmung des Serumgesamteiweißgehaltes und des Albumins bzw. der Globulinfraktionen verwendet, als auch für virologische Arbeiten (Infektionsversuche).

Das Gesamteiweiß wurde nach der Biuret-Methode in einem Eppendorf Digitalphotometer 6115 S bei einer Wellenlänge von 546 nm (Hg) photometrisch bestimmt. Dazu wurden zuvor jeweils 20 μl Serum mit 1000 μl Reagenslösung (0,1 N NaOH, 16 mM K-Na-tartrat, 15 mM KJ, 6 mM CuSO_4) gut gemischt und 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur inkubiert.

Die elektrophoretische Bestimmung des Serumalbumins und der Globulinfraktion wurde in einem Elphor Vario 4 (Fa. Bender und Hobein) auf Acetatfolie bei 230 V und 1 - 1,5 mA pro Streifen durchgeführt. Nach 25 Minuten Laufzeit wurden die Folien in Pufferlösung (pH 8,6 - 8,8) gewaschen, mit Amidoschwarz gefärbt, auf Objektträger aufgebracht und getrocknet. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte elektronisch in einem Elphormat (Fa. Bender und Hobein).

Zur Erstellung des Differentialblutbildes wurden die Erythrozytenzahlen durch den Trübungstest mit Gowerscher Lösung (Merck, Art. 9024) bestimmt. Man versetzt hierzu

20 μ l Blut mit 10 ml Reagens und wertet die Probe im Eppendorf Digitalphotometer bei 578 nm aus.

Zur Leukozytendifferenzierung wurde ein Blutaussstrich nach der Diff-Quick-Schnellfärbungsmethode (Fa. Harleco) gefärbt und in üblicher Weise ausgezählt.

Da uns nur widersprüchliche Angaben über die Normalwerte der Serumeiweiße bei Schafen vorlagen, stellten wir von allen Schafen vor ihrer Infektion sogenannte Nullwerte fest. Sie betrugen für Gesamteiweiß, Albumin, α - und β -Globulin sowie γ -Globulin durchschnittlich 7,5 g %, 53 %, 24 % und 18 %. Unsere Nullwerte für die Leukozytenzahlen stimmen mit den Angaben von KRAFT (1964) überein.

3.6.2.2. Infektionen mit Originalausgangsmaterial

3.6.2.2.1. Virusstamm NSD 045 MB II BHK 1

Das Originalmaterial wurde in 8 ml Yeast-Medium (ohne KS) gelöst. Die Schafe C und D erhielten davon je 1,5 ml (Titer $5 \times 10^{3,8}$ Mäuse LD_{50} /ml) subkutan verabreicht. Zehn Tage p.i. wurden die Schafe C und D zur Materialgewinnung entblutet und seziiert. Von Leber, Niere, Lunge, Dünndarm und Mesenteriallymphknoten nahmen wir Proben, die wir bei -80°C einfroren oder in 9 %igem Formalin fixierten.

3.6.2.2.2. Virusstamm I 105

Wir lösten das gefriergetrocknete Ausgangsmaterial in 5 ml Yeast-Medium (ohne KS, $5 \times 10^{3,6}$ Mäuse LD_{50} /ml) und infizierten damit Schaf I subkutan. Am 7. Tag p.i. wurde Schaf I getötet und Proben von der Pansenwand genommen und bei -80°C gelagert.

3.6.2.3. Direkte Schaf-Schaf-Passagen mit dem Virusstamm 045

Schaf E wurde mit 9 ml eines Serumgemisches von Schaf C, gewonnen zwischen dem 4. und 7. Tag p.i. (Titer $5 \times 10^3 - 5 \times 10^{4,3}$ Mäuse LD₅₀/ml), Schaf F mit 9 ml eines Sammelserums von Schaf D, das von den gleichen Tagen p.i. stammte (Titer $5 \times 10^3 - 5 \times 10^4$ Mäuse LD₅₀/ml), subkutan infiziert. Schaf F wurde am 5. Tag p.i. entblutet und bei der Sektion Organproben (Milz, Leber, Niere, Mesenteriallymphknoten) entnommen und bei -80°C eingefroren.

Am 14. Tag p.i. wurde Schaf E subkutan mit 15 ml Serum von Schaf F vom 5. Tag p.i. (Titer $5 \times 10^{3,75}$ Mäuse LD₅₀/ml) erneut infiziert, 6 Tage später getötet und seziiert.

Eine zweite Schafpassage erfolgte durch Überimpfen von Serum des Schafes F (Titer $5 \times 10^{3,75}$ Mäuse LD₅₀/ml) auf Schaf G (am 14. Tag nach dem Ansetzen von Zecken, sh. 3.6.2.6.) und Schaf H. Beide erhielten 15 ml subkutan verabreicht. Am 20. Tag bzw. am 6. Tag p.i. wurden die Schafe getötet und Blut sowie Organproben (Milz, Leber, Lunge, Dünndarm, Lymphonodus (Ln) mesenterialis) entnommen und bei -80°C eingefroren.

Serum des Schafes G (vom 17. Tag p.i., bzw. vom 3. Tag nach der Challenge-Infektion) diente für die dritte Schafpassage: Wir infizierten Schaf K mit 11 ml (Titer $5 \times 10^{3,75}$ Mäuse LD₅₀/ml) subkutan.

3.6.2.4. Maus-Schafpassagen mit Virusstamm 045

Zur Infektion von Schaf J verwendeten wir 11 ml einer Suspension der 1. Mäusegehirnpassage dieses Virusstammes. Die Babymäuse hatten wir mit Serum der Schafe G bzw. H intracerebral infiziert. Die Titer der Seren lagen jeweils bei $5 \times 10^{3,5}$ Mäuse LD₅₀/ml. Die Gehirne waren moribunden Mäusen am 3. bzw. 5. Tag p.i. entnommen und

mit PBS homogenisiert worden (Titer $5 \times 10^{4,15}$ Mäuse LD_{50}/ml). Schaf J wurde am 14. Tag p.i. entblutet.

3.6.2.5. Infektionsversuche mit Zecken

Bei den Schafen C und D setzten wir mit dem Tag der Infektion Nymphen von *Rhipicephalus appendiculatus* an beiden Ohren an. Die Schafe E, F und H besetzten wir am Infektionstag mit Larven und die Schafe I, J und K mit Larven und Nymphen der gleichen Zeckenspezies. Die Zecken-
zahl betrug jeweils etwa 300. Nymphen, die bei den Schafen C und D während der Fieberreaktion Blut gesaugt hatten, wurden als Adulte, nachdem sie 56 Tage bei $28^{\circ}C$ und 85 % relativer Luftfeuchtigkeit aufbewahrt worden waren, bei Schaf G an beiden Ohren angesetzt.

3.6.2.6. Versuch der Übertragung von NSD-Virus von infantilen Mäusen auf Zecken

Wir infizierten zwei Tage alte Babymäuse mit dem Virusstamm 045 und setzten sie zum gleichen Zeitpunkt in ein Glasgefäß ohne Einstreu, in das wir einige Hundert *Rhipicephalus appendiculatus*-Larven gaben. Nach 3 - 4 Stunden hatten sich bei der Mehrzahl der Mäuse ca. 20 Larven festgesetzt. Wir brachten diese Babymäuse dann zu den Muttertieren zurück.

Bis zum 3. Tag p.i. sammelten wir die vollgesogenen Zecken. Sie wurden nach ihrer Häutung homogenisiert und die Suspension auf infantile Mäuse verimpft.

4. Ergebnisse

4.1. Infektionsversuche mit NSD-Virus bei Säugetieren

4.1.1. Die Infektion bei Schafen (Klinik und Sektionsbefunde)

4.1.1.1. Infektion mit Originalausgangsmaterial

NSD 045 MB II BHK 1

Schaf C reagierte mit einer zweizackigen Fieberkurve zwischen dem 2. und 8. Tag p.i.. Am 2. Tag p.i. stieg die Körpertemperatur auf $41,2^{\circ}\text{C}$, um dann kurz auf $40,8^{\circ}\text{C}$ abzusinken. Am 5. Tag p.i. erreichte sie schließlich ihren Maximalwert von $41,8^{\circ}\text{C}$. Ab dem 4. Tag p.i. machte Schaf C einen schwerkranken Eindruck. Es war apathisch, fraß kaum und setzte breiigen bis wässrigen, dunkelgrün-braunen, stinkenden Kot ab. Die Nüstern waren infolge einer mucopurulenten Rhinitis verkrustet.

Nach einem kurzen Anstieg der Leukozytenzahlen von 8000 auf $10\,000/\text{mm}^3$ (3. Tag p.i.) fielen die Werte am 4. Tag plötzlich auf $5000/\text{mm}^3$ ab; sie erholten sich bis zum Tötungstag auch nicht mehr. Vom 2. bis zum 7. Tag p.i. konnte durch Infektion von Saugmäusen Virus im Serum nachgewiesen werden. Der Virustiter der Serumproben stieg dabei von $5 \times 10^{1,75}$ Mäuse LD_{50}/ml am ersten Fiebertag auf maximal $5 \times 10^{4,3}$ Mäuse LD_{50}/ml am 5. Tag p.i. (4. Fiebertag) und fiel erst am 7. Tag p.i. auf nicht meßbare Werte ab. Die Sektion des Tieres ließ eine katarrhalische Enteritis mäßigen Grades und vergrößerte Mesenteriallymphknoten sowie eine leichte Milzschwellung erkennen.

Bei Schaf D stieg die Körpertemperatur erst am 4. Tag p.i. plötzlich steil an. Sie blieb 4 Tage lang auf Werten über 42°C und fiel erst am 9. Tag p.i. wieder auf Normalwerte ab. Außer Apathie, Fraßunlust und blutig-mucopurulenter Rhinitis waren keine sonstigen

Symptome zu bemerken.

Im Differentialblutbild zeigte sich auch hier ein rascher Leukozytenabfall von $8000/\text{mm}^3$ auf 4600 am 6. Tag p.i.. Vom 4. (Titer 5×10^3 Mäuse LD_{50}/ml) bis zum 8. Tag p.i. (Titer $5 \times 10^{1,8}$ Mäuse LD_{50}/ml) konnte durch Infektion von Babymäusen Virus im Serum nachgewiesen werden. Der höchste Wert von 5×10^4 Mäuse LD_{50}/ml wurde dabei am 5. Tag p.i. (2. Fiebertag) erreicht.

Die makroskopisch-anatomischen Veränderungen waren nicht sehr stark ausgeprägt. Es ließen sich eine leichte Milzschwellung, eine katarrhalische Enteritis und geringgradig vergrößerte Gekröselymphknoten diagnostizieren.

4.1.1.2. Infektion mit NSD-Virusstamm I 105

Wir infizierten Schaf I subkutan mit Originalmaterial. Am 3. Tag p.i. kam es zu einem raschen und sehr hohen Fieberanstieg auf über 42°C mit starken Störungen des Allgemeinbefindens, Futterverweigern und Apathie. Am 7. Tag p.i. (Tötungstag) sank die Temperatur unter 42°C . Mit Fieberbeginn waren die Leukozytenzahlen von 10 200 zunächst auf $4800/\text{mm}^3$ gefallen. Am 7. Tag p.i. waren nur noch 1700 Leukozyten pro mm^3 feststellbar. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Tier in schwer krankem Zustand entblutet. Der Virustiter im Serum betrug am 4. Tag p.i. $5 \times 10^{3,8}$ Mäuse LD_{50}/ml , am 5. Tag $5 \times 10^{4,75}$ Mäuse LD_{50}/ml und betrug am 7. Tag p.i. noch $5 \times 10^{2,75}$ Mäuse LD_{50}/ml .

Bei der Sektion fanden wir flohstichartige Blutungen auf der Schleimhaut der Dentalplatte und unter der Zunge, mehrere bis zu 20×2 cm messende streifige Ekchymosen an der lateralen und ventralen Pansenserosa und Petechien an der Serosa des Caecums und am Gekröse. Die Mesenteriallymphknoten waren stark vergrößert, ihre Schnittfläche sehr feucht.

4.1.1.3. Schaf-Schaf-Passagen

Schaf E wurde mit Serum von Schaf C (Virusstamm 045) subkutan infiziert. Ähnlich wie Schaf C reagierte es vom 3. bis 7. Tag p.i. mit einer zweigipfeligen Fieberkurve (Maximaltemperatur $41,3^{\circ}\text{C}$), das Allgemeinbefinden war jedoch nur mäßig durch eine vorübergehende, mittelgradige Diarrhoe gestört. Es bestand auch hier eine Leukopenie mit Werten, die von 8000 auf $4800 - 6000/\text{mm}^3$ fielen. Vom 3. bis 7. Tag p.i. war Virus im Blut vorhanden. Die höchsten Titer von 5×10^4 Mäuse LD_{50}/ml maßen wir am 1. und 2. Fiebertag, später sanken sie auf $5 \times 10^{2,75}$ Mäuse LD_{50}/ml (5. Tag p.i.) und $5 \times 10^{1,75}$ Mäuse LD_{50}/ml am 7. Tag p.i..

Bei Schaf F, das mit Serum von Schaf D infiziert worden war, konnten ab dem 3. Tag p.i. Körpertemperaturen von über 42°C , starke Apathie und Futterverweigern festgestellt werden. Die Leukozytenzahlen sanken in dieser Zeit von 6000 auf $4600/\text{mm}^3$. Ab dem 3. Tag p.i. war Virus im Serum von Schaf F nachweisbar. Der Titer stieg von 5×10^3 Mäuse LD_{50}/ml am 3. Tag p.i. auf $5 \times 10^{3,75}$ Mäuse LD_{50}/ml am 5. Tag p.i.. Das Tier wurde am 5. Tag p.i. zur Zeit des Höhepunktes der Fieberreaktion entblutet. Bei der Sektion fanden sich eine deutliche pulpöse und follikuläre Milzschwellung und eine katarrhalische Enteritis.

Schaf E erhielt am 14. Tag p.i. (nach seiner klinischen Genesung ab dem 9. Tag p.i.) Serum von Schaf F injiziert. Erwartungsgemäß kam es zu keiner sichtbaren Reaktion, nur die Leukozytenzahlen sanken am 6. Tag nach der Belastung von 8000 auf $4900/\text{mm}^3$. An diesem Tag (20. Tag nach der Erstinfektion) wurde Schaf E zur Immunserumgewinnung getötet. Pathologische Veränderungen konnten bei der Sektion nicht gefunden werden. Eine zweite Schafpassage erfolgte durch Überimpfen von Serum des Schafes F auf Schaf G, das offensichtlich nicht von angesetzten Zecken (siehe 4.1.1.5.)

infiziert worden war. Erst nach der Seruminjektion kam es zu typischen Symptomen von NSD: die Körpertemperaturen stiegen ab dem 2. Tag p.i. auf über 42°C . Auch hier waren Teilnahmslosigkeit, Futterverweigern und Durchfall zu registrieren. Die Leukozytenzahlen fielen von 10 600 auf $3000/\text{mm}^3$ am 6. Tag nach der Seruminjektion. Der Virusgehalt des Serums von Schaf G lag zunächst bei $5 \times 10^{3,75}$ Mäuse LD_{50}/ml am 3. Tag p.i. und fiel dann langsam auf $5 \times 10^{2,5}$ Mäuse LD_{50}/ml am 6. Tag p.i. (Tötungstag). Bei der Sektion fanden wir nur eine pulpöse Milzschwellung und wenige flohstichartige Blutungen im Rektum.

Schaf H wurde ebenfalls mit Serum von Schaf F infiziert. Es reagierte vom 2. bis zum 6. Tag p.i. mit Fiebertemperaturen um 42°C . Die klinischen Symptome beschränkten sich auf Verweigern der Futteraufnahme und Apathie. Die Leukozytenzahlen, die vor der Infektion $6250/\text{mm}^3$ betrugen, sanken bis auf $2000/\text{mm}^3$ am 5. Tag p.i. ab. Schon am 3. Tag p.i. erreichte der Virustiter im Serum $5 \times 10^{4,5}$ Mäuse LD_{50}/ml . Er fiel dann auf $5 \times 10^{1,75}$ Mäuse LD_{50}/ml am 6. Tag p.i. (Tötungstag). Bei der Sektion fanden wir ein ausgeprägtes Lungenödem und feinblasigen, weißlichen Schaum in den Bronchien. Die Milz war durch eine Hyperplasie der Pulpa mittelgradig geschwollen. Der Darmtrakt enthielt kaum Kot und war katarrhalisch entzündet.

Mit Serum von Schaf G führten wir eine dritte Schafpassage auf Schaf K durch. Das Tier reagierte mit hohem Fieber über 42°C ab dem 4. Tag p.i., Freßunlust und Durchfall. Zwar hatte das Tier am 7. Tag p.i. kein Fieber mehr, doch verschlechterte sich das Allgemeinbefinden in den folgenden Tagen zusehends. Schaf K war völlig teilnahmslos und konnte nicht mehr aufstehen. Am 9. Tag p.i. zeigte es Nüsternatmung, war moribund und verendete in der Nacht.

Die Leukopenie war hier besonders stark ausgeprägt. Am 4. Tag p.i. fielen die Werte zunächst von 10 000 auf $7400/\text{mm}^3$, zwei Tage später sanken sie unter $2000/\text{mm}^3$ und erholten sich nicht mehr. Die Serumtiter lagen

am ersten Fiebertag bei $5 \times 10^{3,2}$ Mäuse LD_{50}/ml , am 5. Tag p.i. (2. Fiebertag) bei 5×10^4 Mäuse LD_{50}/ml . Am 6. Tag p.i. war zum letzten mal Virus im Serum von Schaf K nachweisbar (Titer: $5 \times 10^{3,75}$ Mäuse LD_{50}/ml). Weder die letzte Serumprüfung am Tag vor dem Verenden des Tieres (am 8. Tag p.i.) noch die Verimpfung von Thoraxexsudat auf Babymäuse ließ einen Virusgehalt erkennen.

Bei der Sektion fanden wir eine nekrotisierende Endophlebitis der linken Vena jugularis mit Streuung in die lateralen Retropharyngeallymphknoten. Die Schleimhaut des Kehlkopfes und der Trachea war stark hyperämisch. Die Pleurahöhle enthielt bernsteingelbes Exsudat, das Mediastinum war sulzig durchtränkt. Die schwersten Veränderungen bestanden am Herzen. Hier imponierten eine fibrinös-eitrige Perikarditis, eine Myokarditis, sowie subendokardiale Petechien und Ekchymosen. Die Pansen serosa wies laterale Blutungsstreifen auf, Labmagen und Darmtrakt waren katarrhalisch entzündet.

4.1.1.4. Mäusegehirn-Schaf-Passage

Zur Infektion von Schaf J diente eine Suspension der 1. Mäusegehirnpassage des Virusstammes O45. Ab dem 3. Tag p.i. kam es zu einem deutlichen Temperaturanstieg auf maximal $41,7^{\circ}C$. Einen Tag später verschlechterte sich das Allgemeinbefinden zunehmend, das Tier fraß kaum, hatte wässrigen, braungrünen, stinkenden Durchfall mit Tenesmen und eine mucopurulente Rhinitis. Während die Körpertemperatur am 7. Tag p.i. wieder physiologische Werte erreichte, trat erst 5 Tage später eine Besserung des klinischen Bildes ein. Der Kot war nun geformt und das Schaf kaute wieder. Eine Leukopenie war ab dem 4. Tag p.i. festzustellen. Dabei sanken die Werte von 9700 auf $4000/mm^3$. Sie stiegen bis zum Tötungstag am 14. Tag p.i. nur geringgradig auf $6200/mm^3$ an. Bei diesem Schaf waren die höchsten Virus-

titer im Serum ($5 \times 10^{3,1}$ Mäuse LD_{50}/ml) in den ersten zwei Fiebertagen zu messen. Der Virusgehalt fiel dann schon am 5. Tag auf $5 \times 10^{2,75}$ Mäuse LD_{50}/ml . Bereits am nächsten Tag, dem letzten Fiebertag, war kein Virus mehr im Blut nachweisbar.

Bei der Sektion am 14. Tag p.i. ließen sich keine makroskopisch-anatomischen Veränderungen feststellen.

4.1.1.5. Infektionsversuche mit Zecken

Wir setzten adulte *Rhipicephalus appendiculatus*-Zecken auf Schaf G an. Diese Zecken hatten als Nymphen bei Schaf C und D gesaugt. Sie waren von Schaf C am 9. und 10. Tag p.i., also am 1. und 2. Tag nach Ende der Fieberphase, vollgesogen abgefallen. Von Schaf D sammelten wir Nymphen am 5., 6., 7. und 10. Tag p.i., also am 2., 3. und 4. Fiebertag, sowie am 2. Tag nach Ende der Fieberphase.

Schaf G zeigte in den 14 Tagen nach Ansetzen der Zecken keinerlei Reaktion. Auch im Differentialblutbild waren keine Veränderungen festzustellen. Nach der Injektion von virus-haltigem Serum von Schaf F reagierte Schaf G mit den für NSD typischen Symptomen (siehe 4.1.1.3.).

4.1.1.6. Verimpfung von Zeckenverreibungen auf Saugmäuse

Zecken von Schaf D, die als Nymphen am 7. Tag p.i. abgefallen waren, wurden nach ihrer Häutung verrieben und als 10 %ige Suspension i.cer. und i.p. auf Babymäuse verimpft. Als Kontrolle dienten Saugmäuse, die eine entsprechende Suspension von ungesogenen adulten *R. appendiculatus*-Zecken erhalten hatten. In keiner der beiden Gruppen konnten Todesfälle registriert werden.

Genauso verfahren wir mit Nymphen, die als Larven vollgesogen am 5. Tag p.i. von Schaf H abgefallen waren. Auch bei ihnen konnte mit gleicher Technik kein Virus nachgewiesen werden.

4.1.1.7. Prüfung der Infizierbarkeit von Zecken an infantilen Mäusen

Es gelang nicht, in Larven von *R. appendiculatus*, die an infizierten Mäusen Blut gesaugt hatten und nach ihrer Häutung homogenisiert und auf neue Babymäuse verimpft wurden, NSD-Virus nachzuweisen, obwohl die Babymäuse, die als Wirte gedient hatten, der Infektion später erlegen waren.

4.1.2. Verhalten der Werte für Gesamteiweiß, Albumin, α -, β - und γ -Globulin im Serum der Versuchsschafe

Bei allen erfolgreich infizierten Schafen war eine Erhöhung vor allem der γ -Globulinwerte nachweisbar. In der Regel begannen diese mit Fieberbeginn anzusteigen, d.h., ab dem 3. bis 4. Tag p.i.. Der Anstieg der Werte war allerdings nicht sehr ausgeprägt. Wir beobachteten selbst bei den Schafen, die heftig auf die Infektion reagierten (Schaf D, F, G, H, I), nur einen Anstieg um etwa 30 %. Die gemessenen Werte für das Gesamteiweiß, die Albumine, die α - und β -Globulinfractionen waren nicht einheitlich genug, um daraus Rückschlüsse auf den Infektionsverlauf ziehen zu können. In einigen Fällen zeigten die Werte während der Fieberphase eher leicht abfallende Tendenz.

4.1.3. Virusgehalt von Organsuspensionen erkrankter Schafe nach Infektion mit dem Virusstamm 045

Die höchsten Virusmengen waren in der Leber von Schaf F vorhanden (Titer $5 \times 10^{5,25}$ Mäuse LD₅₀/ml). Auch der Mesenteriallymphknoten (Titer $5 \times 10^{4,75}$ Mäuse LD₅₀/ml) und die Milz (Titer 5×10^4 Mäuse LD₅₀/ml) waren noch stark positiv. In der Niere waren jedoch geringere Virusmengen nachweisbar. Der Titer betrug hier $5 \times 10^{2,25}$ Mäuse LD₅₀/ml.

Schaf G zeigte ähnliche Ergebnisse.

Die Milz enthielt Virusmengen von $5 \times 10^{4,5}$ Mäuse LD_{50}/ml , während die Leber etwas weniger stark positiv war (Titer 5×10^4 Mäuse LD_{50}/ml).

Die Organe von Schaf H, dessen Körpertemperaturen zum Zeitpunkt der Tötung schon fast auf physiologische Werte gesunken war ($40,7^{\circ}C$), enthielten noch beachtliche Virusmengen, nämlich 5×10^4 Mäuse LD_{50}/ml in der Leber und der Milz.

4.2. NSD-Infektion von Saugmäusen

4.2.1. Klinisches Bild

Bei Babymäusen war das Symptomenbild nach Infektion mit den Virusstämmen 045 und I105 in etwa gleich, sieht man davon ab, daß die Tiere nach Infektion mit dem Stamm NSD I 105 ein bis 2 Tage früher verendeten als nach der mit Stamm 045, wo der Tod nach 5 - 7 Tagen eintrat.

Etwa 3 - 4 Tage p.i. begannen die Babymäuse bei noch unverminderter Sauglust zu zittern und ataktische Bewegungen auszuführen. Im Gegensatz zu gleichaltrigen Kontrolltieren hatte die Haut der kranken Saugmäuse eine schmutziggelbliche Verfärbung. Erst kurz vor dem Verenden stellten die Babymäuse den Saugakt ein, so daß viele mit noch milchgefülltem Magen tot aufgefunden wurden. Ein sicheres Zeichen der angegangenen Infektion war häufiges Putzen der Schnauze, eine zunehmende zyanotische Verfärbung der Haut und Vorstrecken der Zunge. Die Tiere starben unter akuter Atemnot und Streckkrämpfen der Vorder- und Hinterextremitäten nach kaudal. Diese Krämpfe konnten durch Berührung willkürlich ausgelöst werden.

4.2.2. Vergleich der i.cer. und i.p. Virusapplikation

Babymäuse, die vom gleichen Virusmaterial 0,02 ml i.cer. bzw. 0,1 ml i.p. erhalten hatten, reagierten zur gleichen

Zeit und in gleicher Weise. Bei der gleichzeitigen i.cer. und i.p.-Verabreichung von Virusmaterial verkürzte sich die Zeit bis zum Verenden der Saugmäuse bei beiden Virusstämmen um die Hälfte des nach ausschließlich i.cer. Applikation zu beobachtenden Zeitraumes, so daß die Tiere schon nach 3 - 4 (Stamm 045) bzw. 2 - 3 (Stamm I105) Tagen starben.

4.3. Verhalten des NSD-Virus in Zellkulturen

4.3.1. Die Virusvermehrung in Subkulturen

4.3.1.1. Die Infizierung von sekundären Hamsternierenzellkulturen

Bei sekundären Hamsternierenzellkulturen trat schon bei der ersten Passage des Virusstammes 045 ein zytopathischer Effekt (z.p.E.) auf. Vier bis fünf Tage p.i. begannen die Zellen sich zusammenzuziehen und teilweise abzukugeln. Mit fortschreitender Zerstörung des Zellrasens fand man immer mehr abgelöste, schwimmende Zellen, Reste des Zellrasens hafteten noch mit fadenartig dünnen Zytoplasmabrücken an der Wand des Kulturgefäßes. Sechs bis neun Tage p.i. war der Zellrasen völlig zerstört und es hingen lediglich vereinzelte Klumpen veränderter Zellen an der Gefäßwand.

Nach Beimpfung mit NSD-Virus Stamm I 105 trat ein eindeutiger z.p.E. erst in der 4. Passage auf. Er unterschied sich von dem des Stammes 045 nicht.

4.3.1.2. Die Infizierung tertiärer Schafnierenzellkulturen

In diesem Wirtssystem fiel der z.p.E. oft ganz unterschiedlich aus. Nach Beimpfung mit dem Virusstamm 045 fanden wir jedoch auch hier schon in der ersten Passage Zellschrumpfung und Abkuglung. Nach 6 - 11 Tagen schwammen massenhaft abgelöste Zellen im Medium, der Rest der noch haftenden war

zum größten Teil in Haufen zusammengeballt. Auch hier bildeten sich fadenförmige, dünne Zellplasmabrücken, doch war dieser Effekt nicht ganz so stark ausgeprägt wie bei den Hamsternierenzellen. Nach einer Passage mit starkem z.p.E. folgte manchmal eine, bei welcher der Zellrasen nur aufgelockert und löcherig erschien, oder sich die Schrumpfformen auf bestimmte Areale beschränkten.

Der durch den Stamm I 105 verursachte z.p.E. war im allgemeinen schwächer ausgeprägt. Nach 6 - 11 Tagen wirkten die Zellen aufgelockert und das Zytoplasma "schaumig" mit kleinen Vakuolen durchsetzt. Zellschrumpfung und Ablösung traten nicht so massiv in Erscheinung wie beim Stamm 045. Art und Stärke des z.p.E. schienen auf den Grad der Virusvermehrung beider Stämme in Hamster- und Schafnierzellkulturen keinen Einfluß zu haben. Intracerebral infizierte Saugmäuse verendeten innerhalb von 5 - 7 Tagen. Die Virustiter betrugen bei beiden Zellarten für den Stamm 045 im Schnitt $5 \times 10^{3,75}$ Mäuse LD₅₀/ml und für den Stamm I 105 durchschnittlich 5×10^4 Mäuse LD₅₀/ml.

4.3.2. Die Virusvermehrung in Zelllinien

4.3.2.1. Die Infizierung von BHK 13-Zellen

Auch in der Zelllinie BHK 13 trat der z.p.E. unregelmäßig und ungleichmäßig ausgebildet auf. In den ersten Passagen kam es meist zu Granulierung einzelner Zellgruppen, seltener zu Quellungen 5 - 8 Tage p.i.. In späteren Passagen traten auch Plaques auf, an deren Rand sich die geschädigten Zellen vielschichtig zusammenzogen. Dazwischen gab es aber auch Viruspassagen, deren z.p.E. sich nur in einer Auflockerung des Zellrasens oder in einer Quellung, Granulierung und Abkugelung der Zellen äußerte. Die unterschiedliche Ausbildung des z.p.E. hatte offensichtlich keinen erheblichen Einfluß auf die Virusvermehrung, da mit jeder

Passage unabhängig von der Art ihres z.p.E. Babymäuse erfolgreich infiziert werden konnten.

Während 26 Passagen des Virusstammes 045 konnten wir eine Titersteigerung von $5 \times 10^{4,7}$ Mäuse LD_{50}/ml auf $5 \times 10^{5,5}$ Mäuse LD_{50}/ml registrieren.

4.3.2.2. Die Infizierung von C_6 -Zellen

Die Zellen der Linie C_6 zeigten nach Beimpfung mit dem NSD-Virusstamm 045 in den ersten Passagen noch keinen z.p.E.. Eindeutige virusbedingte zytopathische Veränderungen traten zum ersten Mal nach 8 Passagen, von da an jedoch regelmäßig auf. Der z.p.E. äußerte sich nach 5 - 7 Tagen p.i. zuerst durch eine Quellung der Zellen, später verloren diese immer mehr ihre ursprünglich runde Form, die Zellgrenzen waren verwaschen und gingen später in zahlreichen Zellgruppen ganz verloren. Schließlich bildeten sich viele Riesenzellen. Zwischen dem 8. und 11. Tag p.i. war meist der ganze Zellrasen so verändert.

Der Virusstamm I 105 verhielt sich ähnlich. Auch hier trat ein regelmäßiger z.p.E. erst nach mehreren (fünf) Viruspassagen auf. Die Riesenzellbildung war allerdings nicht ganz so massiv ausgeprägt. Passagen beider Virusstämme konnten erfolgreich auf Babymäuse verimpft werden. Die Titer lagen für beide Stämme bei Werten von $5 \times 10^{3,75}$ - 5×10^4 Mäuse LD_{50}/ml . Nach Infektion mit dem Stamm I 105 verendeten die Babymäuse in der Regel schon nach 3 - 4, beim Stamm 045 erst nach 5 - 6 Tagen.

4.3.2.3. Infizierung von 3T6 - und Verozellen

Weder bei 3T6 - noch bei Verozellen zeigte sich nach Beimpfung mit dem NSD-Virusstamm 045 ein z.p.E.. Es wurden 3 Blindpassagen durchgeführt. Eine Virusvermehrung ließ sich durch Verimpfung von Zellkulturmaterial auf infantile Mäuse nicht nachweisen.

4.3.2.4. Infizierung von Arthropodenzellen

4.3.2.4.1. Aedes albopictus- und Aedes aegypti-Zellkulturen

Versuche, den NSD-Virusstamm 045 in diesen beiden Insektenzellkulturen zu züchten, schlugen fehl. Ein z.p.E. trat bei 3 durchgeführten Passagen nicht auf. In Babymäusen, die Kulturmaterial i.p. erhalten hatten, konnten wir keine Virusvermehrung nachweisen.

4.3.2.4.2. Zeckenzelllinie TTC-243

Nach Beimpfung mit dem NSD-Virusstamm 045 konnten wir bei den Zeckenzellen keinen eindeutigen z.p.E. feststellen. Eine ab etwa dem 14. Tag p.i. auftretende Quellung war vermutlich auf degenerative Prozesse durch Überalterung zurückzuführen. Jeder der am 4., 6. und 12. Tag p.i. abgenommenen Zellkulturüberstände der ersten Viruspassage von jeweils 15 ml hatte einen Virusgehalt von über $7,5 \times 10^{5,5}$ Mäuse LD₅₀.

Mit Zellkulturüberstand vom 17. Tag p.i. infizierten wir eine neue Zeckenzellkultur. Kulturüberstand vom 3., 6. und 10. Tag p.i. dieser ersten Viruspassage in Zeckenzellen hatte einen Titer von 5×10^2 Mäuse LD₅₀/ml bzw. $5 \times 10^{3,5}$ Mäuse LD₅₀/ml und $5 \times 10^{2,75}$ Mäuse LD₅₀/ml.

4.4. Histologische Untersuchungen

4.4.1. Einschlußkörperchenbildung nach Infektion von Zellkulturen

4.4.1.1. Einschlußkörperchen in Schafnierenzellen

Ab dem 6. Tag p.i. konnte bei den Virusstämmen 045 und I 105 schon an ungefärbten Deckglaskulturen ein fortschreitender z.p.E. mit Zellschrumpfung, Abkuglung und allgemeiner Auflockerung des Zellrasens beobachtet werden. Nach Beimpfung mit dem Virusstamm 045 ließen sich im gefärbten Präparat frühestens ab dem 3. Tag p.i. Veränderungen gegenüber der Kontrolle feststellen. Das Zytoplasma einzelner Zellen wies eosinophile flächige Verdichtungszone ohne bestimmte Struktur auf. Am 4. Tag p.i. konnten wir die ersten, aber noch selten auffindbaren, typischen Einschlußkörperchen beobachten. Sie imponierten als maschenartige, unregelmäßige Gebilde, die den Zellkern z. T. ringförmig umgaben, oder seinen beiden Polen angelagert waren. Schon am folgenden Tag hatte die Zahl der Einschlußkörperchen erheblich zugenommen, und es wurden jetzt auch andere zytopathische Veränderungen, wie Zellschrumpfung und Kerndegeneration, deutlich. Mit fortschreitendem z.p.E. nahm die Zahl der Einschlußkörperchen bis zum 8. Tag p.i. nur noch geringfügig zu.

Der Virusstamm I 105 verhielt sich ähnlich, doch setzten die Veränderungen etwas schneller ein und verliefen auch rascher. So fanden wir hier schon am 3. Tag p.i. vereinzelte Einschlußkörperchen, die innerhalb der folgenden Tage zahlenmäßig stark zunahmen, jedoch stets weniger zahlreich waren, als bei dem NSD-Virusstamm 045. Die anderen zytopathischen Veränderungen des Zellrasens waren hier jedoch stärker ausgeprägt.

4.4.1.2. Einschlußkörperchen in C₆-Zellen

Im Nativpräparat konnten ab dem 6. Tag p.i. beim Stamm 045 und ab dem 5. Tag p.i. beim Stamm I 105 erste zytopathische Veränderungen wie Quellung und Verschwinden der Zellgrenzen mit Riesenzellbildung beobachtet werden.

Im gefärbten Präparat waren die ersten eindeutigen Veränderungen nach Beimpfung mit dem Stamm 045 erst ab dem 4. Tag p.i. zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt waren keine Einschlußkörperchen der oben beschriebenen Form, jedoch eine beginnende Riesenzellbildung zu bemerken. Am 5. Tag p.i. waren auch die üblichen Einschlußkörperchen zu finden. Die Zahl der verschiedenen großen Riesenzellen nahm ständig zu. Schon nach weiteren zwei Tagen konnten wir bei diesem Virusstamm keine Einschlußkörperchen mehr, jedoch immer mehr und größere Riesenzellen nachweisen, die am 8. und 9. Tag p.i. 80 - 90 % des Zellrasens ausmachten und zum Teil bis zu 30 Zellkerne enthielten.

Im Gegensatz dazu fanden wir nach Beimpfung mit dem Stamm I 105 schon am 1. Tag p.i. vereinzelte, aber deutliche Einschlußkörperchen, die am 2. und 3. Tag zahlenmäßig zunahmen. Jetzt setzte auch hier (einen Tag früher als bei NSD 045) die Bildung von Riesenzellen ein, während gleichzeitig die Einschlußkörperchen verschwanden (ab dem 4. - 5. Tag p.i. konnten wir kaum noch welche nachweisen). Die ursprünglich runden Zellen veränderten auch ihre Form: sie wurden epithelartig. Im ganzen waren die Riesenzellen jedoch hier nie so zahlreich und groß wie nach Verimpfung des Stammes 045.

4.4.2. Histologische Veränderungen im Saugmausgehirn

Im Gehirn moribund getöteter Saugmäuse, die mit dem Virusstamm 045 i.cer. infiziert worden waren, traten besonders im grauen Rindenband, seltener in den Hirnhäuten,

Verflüssigungsnekrosen auf, die zum Teil straßenartig ausgebildet waren. Die in ihrer Nähe verlaufenden Gefäße wiesen Endothelschwellungen und perivaskuläre Lymphozyteninfiltrate auf.

4.4.3. Histologische Veränderungen in Organen infizierter Schafe

Von Schaf C und D, die beide mit Stamm 045 erfolgreich infiziert worden waren, wurden Leber, Milz, Niere, Mesenteriallymphknoten und Dünn- sowie Dickdarm (Ileum und Colon) histologisch untersucht. Folgende Befunde sind erwähnenswert:

Bei Schaf C fanden wir in der Leber eine geringgradige Rundzellinfiltration im Bereich des Glissonschen Dreiecks. Die Nierenglomerula waren meist unverändert, selten fand sich im Kapselraum kugeliges, homogenes, leicht eosinophiles Material (Proteinablagerungen?). In den Tubuli der Nierenpapille waren vereinzelt Kalkzylinder nachweisbar.

Der Mesenteriallymphknoten wies eine relativ starke, doch wahrscheinlich unspezifische Hyperämie auf. Daneben konnte hier aber eine lymphatische Hyperplasie der Follikel mit Bildung von Sekundärknoten festgestellt werden.

Auch bei Schaf D war eine dezente periportale Zellinfiltration zu finden, die Leberzellen waren leicht vakuolig verändert.

Die Milz war sehr hyperämisch, die Follikel jedoch ebenfalls unverändert. Der Befund der Niere entsprach dem bei Schaf C.

5. Diskussion des experimentellen Teiles

Die Infektion von deutschen Schafen (Merino-Landschaf und Schwarzköpfiges Fleischschaf) mit virulentem Nairobi Sheep Disease (NSD)-Virus gab zu typischen Symptomen dieser Krankheit Anlaß. Die Inkubationszeit (im Durchschnitt 2,8 Tage) und die Dauer der Fieberphase (4 - 6 Tage) stimmten dabei mit den Angaben in der Literatur überein (DAUBNEY und HUDSON 1931, TERPSTRA 1969).

Als charakteristische, pathologisch-anatomische Veränderungen der NSD werden im Schrifttum in erster Linie blutig-katarrhalische Gastroenteritiden und eine Tubulo-Glomerulo-Nephritis angegeben. Wir konnten überraschenderweise bei unseren Versuchstieren ausgeprägte Veränderungen dieser Art auch histopathologisch nicht feststellen. Die Geringfügigkeit der Sektionsbefunde steht bei unseren Schafen, die als voll empfänglich gelten konnten und parasitenfrei waren, in einem nicht erklärbaren Gegensatz zu den beobachteten schweren klinischen Symptomen. Besonders auffallend war dabei, daß trotz des teilweise außerordentlich hohen Fiebers von über 42°C und schwerer gastro-intestinaler Störungen direkte Todesfälle nicht auftraten.

Diese Erfahrung steht im Einklang mit den Beobachtungen von TERPSTRA (1969), nach denen die Mortalität bei europäischen Schafrassen geringer als bei afrikanischen ist. Inwieweit die guten Versuchs- und Haltungsbedingungen unserer Tiere dazu beigetragen haben, daß es zu keinen direkten Todesfällen kam, muß dahingestellt bleiben.

Für die Spezifität der Symptome spricht der Nachweis einer zum Teil hochgradigen Virämie während der Fieberphase. Die Überimpfung von Serum aus dieser Zeit auf infantile Mäuse ließ diese regelmäßig erkranken und sterben. In allen unseren Untersuchungen fanden wir keine Hinweise auf eine Mitwirkung von bzw. Verunreinigungen mit anderen pathogenen Erregern.

Bei nachgewiesenen Virustitern von maximal $5 \times 10^{4,75}$ Mäuse LD_{50}/ml wäre zu erwarten gewesen, daß die angesetzten Nymphen und adulten Rhipicephalus appendiculatus-Zecken den Erreger aus dem Blut aufnehmen und auf empfängliche Schafe transferieren. Es gelang uns jedoch nicht, den natürlichen Übertragungsweg nachzuvollziehen.

Die Infektion der Schafe war begleitet von einer typischen und starken Leukopenie. Durchschnittlich fielen die Leukozytenzahlen um 40 - 70 % der ursprünglichen Werte ab. MUGERA und CHLMA (1967) haben ebenfalls bei der NSD-Infektion eine Leukopenie beschrieben. Die Veränderungen der übrigen Serumwerte (Gesamteiweiß, Albumine und Globuline) waren nicht so einheitlich, als daß wir daraus allgemeine Schlüsse ziehen können.

NSD-Virus konnten wir in hohen Dosen besonders aus Leber, Mesenteriallymphknoten und Milz rückisolieren, auch wenn diese Organe nicht auffällig verändert waren.

Nach TERPSTRA (1969) und WEINBREN et al (1958) eignet sich die i.cer. Infektion von infantilen Mäusen gut zur Virusisolation und -diagnostik. Nach unseren Befunden ist eine i.p. Infektion etwa 5 mal weniger sensitiv als die i.cer. Infektion. Werden jedoch Baby-mäuse im Alter bis zu 4 Tagen zugleich i.cer. und i.p. infiziert, so resultiert daraus eine Verkürzung der Inkubationszeit von normalerweise 5 - 7 Tagen auf etwa 3 Tage. Diese Methode scheint besonders geeignet zu sein zum schnellen Nachweis kleinerer Virusmengen.

Unsere Ergebnisse aus der Züchtung von NSD-Virus in Hamster- und Schafnierenzellen stimmen mit den Angaben in der Literatur bezüglich der Charakteristika des z.p.E., der Einschlußkörperchenbildung und der erzielten Virustiter überein. In Vero-Zellen und in der Mäusezelllinie 3T6 konnte keine Virusvermehrung festgestellt werden. Die fehlende Empfänglichkeit der 3T6-Zellen steht im Gegensatz zu der

Möglichkeit der NSD-Viruszüchtung in infantilen und erwachsenen Mäusen (WEINBREN et al 1958). Ein umgekehrtes Verhalten besteht offenbar bei der Ratten-Zelllinie C₆. Hier konnte eine eindeutige, über Passagen nachweisbare Virusvermehrung festgestellt werden, wobei es zu einem z.p.E. in Form von Riesenzellen kommen kann. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Spezifität dieses Effektes abzuklären. DAVIES (1972) und COACKLEY und PINI (1965) beschrieben einen z.p.E. des NSD-Virus in Hamsternierenzelllinien. In der von uns verwendeten, laufend auf Freisein von Mykoplasmen geprüften BHK 13-Zelllinie konnten wir zwar die höchsten Viruserträge gegenüber den anderen Säugetierzellen nachweisen (bis zu $5 \times 10^{5,5}$ Mäuse LD₅₀/ml), trotzdem ließ sich nicht regelmäßig ein z.p.E. in infizierten Kulturen feststellen.

Zunehmende Bedeutung gewinnt die Züchtung von Arboviren in Arthropodenzellen. Wir prüften das Verhalten von NSD-Virus in Zelllinien von *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* und *Rhipicephalus appendiculatus* (Zelllinie TTC-243).

In den *Aedes*-Zellen konnten wir weder morphologische Veränderungen des Zellrasens, noch eine Virusvermehrung nachweisen. Nach MUSSGAY und Mitarbeitern (1975) ermöglicht eine Arthropodenzelllinie im allgemeinen nur dann die Vermehrung eines Arbovirus, wenn auch in der Natur entsprechende Wechselbeziehungen zwischen Arbovirus und Überträger bestehen. BUCKLEY (zit. von MARAMOROSCH, 1975) fand, daß alle von Moskitos übertragenen Arboviren sich in *Aedes*-Zelllinien vermehren können, während durch Zecken oder Sandfliegen übertragene Virusarten sich nur dann in solchen Zelllinien vermehren können, wenn sie gegen Lipidlösungsmittel relativ resistent sind. Das NSD-Virus wird durch solche Stoffe inaktiviert.

Unsere bisher durchgeführten Titrations von Kulturüberständen (unter Berücksichtigung der Infektionsmethodik bzw. der Materialentnahmetechnik -

Entfernung des Animpfmateri als 3 Stunden p.i., 4 maliger Wechsel des Mediums in 12 Tagen -) sprechen dafür, daß es in TTC-243-Zellen wenigstens über 17 Tage zu einer ständigen Virusvermehrung gekommen war, ohne daß dabei ein z.p.E. auftrat. Der Nachweis von NSD-Virus im Zeckenzellkulturmedium ohne sichtbare Zellschädigung spricht für eine kontinuierliche Ausschleusung des Erregers aus der virusproduzierenden Zelle. Ergebnisse von Versuchen, das NSD-Virus in dieser Zeckenzellart zu passieren, waren bisher positiv.

Über die erfolgreiche Züchtung von anderen durch Zecken übertragenen Viren (Louping ill-, Langat-, Quaranfil-, Zirqa-, Lanjan- und Ketarah-Virus) in einer Zeckenzelllinie berichteten jüngst VARMA und Mitarbeiter (1975).

Die hier beschriebene erfolgreiche Züchtung von NSD-Virus in einer Zelllinie von *Rhipicephalus appendiculatus* steht in einem gewissen Gegensatz zu den nicht gelungenen Versuchen, den Erreger in seinem natürlichen Überträger, der Zecke *Rhipicephalus appendiculatus*, nach ihrer Blutmahlzeit an Schafen im Stadium der Virämie und an infantilen Mäusen nachzuweisen. Hierfür können verschiedene Gründe diskutiert werden. Es ist denkbar, daß z.B. der verwendete Zeckenstamm nicht optimal empfänglich für den Erreger war. MURPHY (1975) diskutiert in diesem Zusammenhang im Arthropoden selbst liegende Faktoren, wie Interferonbildung und Interferenzerscheinungen zwischen miteinander konkurrierenden homologen Viren.

Eine Züchtbarkeit von NSD-Virus in *Rhipicephalus appendiculatus*-Zellen eröffnet möglicherweise für Studien zur Biologie dieses Erregers, insbesondere für Attenuierungsversuche im Hinblick auf die Herstellung von Lebendimpfstoffen, erfolgversprechende neue Aspekte.

6. Zusammenfassung

Der Literaturteil der Arbeit umfaßt eine eingehende Darstellung der Nairobi Sheep Disease und ihres Erregers. Im experimentellen Teil werden Infektionsversuche mit Schafen zur Reproduktion der Krankheit und zur Materialgewinnung, die Infektion von infantilen Mäusen, Versuche zum Zellspektrum des Erregers, sowie Übertragungsversuche mit *Rhipicephalus appendiculatus*-Zecken beschrieben.

Eine nicht letal verlaufende Nairobi Sheep Disease konnte in Merino-Landschafen und Deutschen Schwarzköpfigen Fleischschafen hervorgerufen werden. Sie war durch hohes Fieber, gastrointestinale Störungen, eine *Viraemie*, starke Leukopenie und einen leichten Anstieg der γ -Globulinwerte charakterisiert.

Zum Virusnachweis eigneten sich 1 - 4 Tage alte Mäuse. Die gleichzeitige intraperitoneale und intracerebrale Applikation führte zu einer Verkürzung der Inkubationszeit. Sie scheint für den Nachweis geringer Virusmengen besonders geeignet zu sein.

Züchtungsversuche in folgenden Zelllinien verliefen negativ: Vero, 3T6, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*.

Der Erreger konnte in sekundären Hamsternieren- und tertiären Schafnierenzellen, in der Zelllinie BHK 13, in einer Astrozyten-Zelllinie der Ratte, sowie in einer Zelllinie von *Rhipicephalus appendiculatus* (TTC-243) vermehrt werden. Ein zytopathischer Effekt trat nur unregelmäßig und abhängig von der Zellart auf.

Summary

Nairobi Sheep Disease - a Synoptic Representation of the Disease as well as Experiments Concerning the Behaviour of Its Agent in Vivo and in Vitro

The first part of this thesis represents a review of the hitherto published literature on Nairobi Sheep Disease and its agent.

The second part describes the reproduction of the disease in sheep, the infection of suckling mice, and experiments concerning the cell spectrum of the virus as well as trials to transmit the disease with *Rhipicephalus appendiculatus*.

Non lethal Nairobi Sheep Disease could be induced in Merinolands-sheep and German Black-headed sheep. The disease was characterized by high fever, heavy gastrointestinal disorders of relatively short duration, a significant leucopenia and a slight increase of γ -Globulin.

Nairobi Sheep Disease-virus caused a lethal infection in one to four days old mice. A simultaneous intraperitoneal and intracerebral application of the virus lead to a shortening of the incubation period. This method seems to be qualified to detect low virus concentrations.

We did not succeed to achieve virus multiplication in Vero, 3T6, *Aedes aegypti*, and *Aedes albopictus* cells. Virus reproduction occurred in secondary hamster kidney cells and in sheep kidney cells, in the cell line BHK 13, in a astrocyte cell line of the rat, as well as in *Rhipicephalus appendiculatus* cells (cell line TTC-243).

In mammalian cells a c.p.e. could be demonstrated only irregularly and depending on the cell type. No c.p.e. could be observed in virus producing monolayers of *Rhipicephalus appendiculatus* cells.

7. Literaturverzeichnis

- ANSELL, R.H. Attenuation of Nairobi Sheep
Disease Virus in the Mouse Brain.
Vet. Rec., 69, 410 1957
- CASALS, J. International Arbovirus Research.
Med. Biol., 53, 249 1975
- COACKLEY, W. and
PINI, A. The Effect of Nairobi Sheep Di-
sease Virus on Tissue Culture
Systems.
J. Path. Bact., 90, 672 1965
- DAUBNEY, R. and
HUDSON, J.R. Nairobi Sheep Disease.
Parasitology, 23, 507 1931
- DAUBNEY, R. and
HUDSON, J.R. Nairobi Sheep Disease: Natural
and Experimental Transmission by
Ticks Other than Rhipicephalus
Appendiculatus.
Parasitology, 26, 496 1934
- DAVIES, F.G. East African Virus Res. Org.,
Muguga, Kenya
Ann. Rep., 15 1972
- DAVIES, F.G.,
MUNGAI, J. and
SHAW, T. A Nairobi Sheep Disease Vaccine.
Vet. Rec., 94, 128 1974
- DAVIES, F.G.,
JESSETT, D.M. and
OTIENO, S. The Antibody Response of Sheep
Following Infection with Nairobi
Sheep Disease Virus.
Vet. Bull., 47, 195 1977

- | | | |
|--|--|------|
| EDELSTEN, R.M. | The Distribution and Prevalence of Nairobi Sheep Disease and Other Tick-Borne Infections of Sheep and Goats in Northern Somalia. | |
| | Trop. Anim. Hlth. Prod., <u>7</u> , 29 | 1975 |
| ELBL, A. and
ANASTOS, G. | Ixodid Ticks of Central Africa.
Vol. III | 1966 |
| | Verlag: Musée Royal de L'Afrique Centrale - Tervuren, Belgique | |
| FENNER, F. | Classification and Nomenclature of Viruses. | |
| | Sec. Rep. Intern. Committee on Taxonomy of Viruses | 1976 |
| HOWARTH, J.A. and
TERPSTRA, C. | The Propagation of Nairobi Sheep Disease Virus in Tissue Culture. | |
| | J. Comp. Path., <u>75</u> , 437 | 1965 |
| JESSETT, D.M.,
DAVIES, F.G. and
RWEYEMAMU, M.M. | An Indirect Hemagglutination test for the Detection of Antibody to Nairobi Sheep Disease Virus. | |
| | Res. Vet. Sci., <u>20</u> , 276 | 1976 |
| KIRYA, G.B.,
TUKEL, P.M., LULE, M.
and MUJOMBA, E. | Parasitosis of Man and Animals in Africa. NSD in Man. | |
| | Proceedings of the 1972 Annual Scientific Conference of the East African Med. Res. Council,
Dar es Salaam, Chapter 7, Paper 6 | 1972 |
| KRAFT, H. | Labormethoden der Veterinärmedizin bei Haussäugetieren. | |
| | 2. Auflage 1964, Leikdruck GmbH, Kelheim | 1964 |

- LEIBOVITZ, A. The Growth and Maintenance of
Tissue Cell Cultures in Free Gas
Exchange with the Atmosphere.
Am. J. Hyg., 78, 173 1963
- LEWIS, E.A. Nairobi Sheep Disease: The Sur-
vival of the Virus in the Tick
Rhipicephalus Appendiculatus.
Parasitology, 37, 55 . 1946
- LEWIS, E.A. Nairobi Sheep Disease
Annu. Rep. Dep. Vet. Serv.
Kenya 1947, -, 51 1949
- MARAMOROSCH, K. USA-Japan Seminar on Invertebrate
Tissue Culture: Basic Applications
Bio Science, 25, 589 1975
- MITSUHASHI, J. and
MARAMOROSCH, K. Leafhopper Tissue Culture:
Embryonic, Nymphal and Imaginal
Tissue from Aseptic Insects.
Contrib. Boyce Thompson Inst.,
22, 435 1964
- MONTGOMERY, R.E. On a Tick-Borne Gastro-Enteritis
of Sheep and Goats Occurring in
British East Africa.
J. Comp. Path. Ther., 30, 28 1917
- MUGERA, G.M. and
CHEMA, S. Nairobi Sheep Disease: A Study of
its Pathogenesis in Sheep, Goats
and Suckling Mice.
Bull. epiz. Dis. Afr., 15, 337 1967
- MUNZ, E. und
GÖBEL, E. In vivo und in vitro Untersuchun-
gen zur weiteren Charakterisie-
rung des Virus der Nairobi Sheep
Disease.
Tagung deutschsprach. Tropenmed.
Ges, Lindau 1977

- MURPHY, F.A. Cellular Resistance to Arbovirus-Infection.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 266, 197 1975
- MUSSGAY, M., ENZMANN, P.J.
HORZINEK, M.C. und
WEILAND, E. Growth Cycle of Arboviruses in Vertebrate and Arthropod Cells.
Progr. med. Virol., 19, 257 1975
Verlag Karger, Basel
- OHDER, H., LUND, L.J. and
WHITELAND, A.P. Observations on the Growth and Development of Bluetongue, Nairobi Sheep Disease and Rift Valley Fever Viruses by Fluorescent Antibody Technique and Titration in a Tissue Culture System.
Arch. ges. Virusforsch., 29, 127 1970
- REED, L.J. and
MUENCH, H. A Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints.
Amer. J. Hyg., 27, 493 1938
- SIMPSON, D.I.H.,
COYLE, T.J. and
WILLIAMS, M.C. Nairobi Sheep Disease Vaccine Trial.
East African Virus Res. Inst.
Ann. Rep. p. 21 1962/63
- TERPSTRA, C. Nairobi Sheep Disease - Studies on Virus Properties, Epizootology and Vaccination in Uganda.
Diss., Universität Utrecht 1969
- VARMA, M.G.R., PUDNEY, M.
and LEAKE, C.J. The Establishment of Three Cell Lines of the Tick Rhipicephalus Appendiculatus (Acari: Ixodidae) And Their Infection With Some Arboviruses.
J. Med. Ent., 11, 698 1975

WALKER, J.B.

The Ixodid Ticks of Kenya
Commonwealth Inst. of Entomol.;
London

1974

WEINBREN, M.P.,
GOURLAY, R.N.,
LUMSDEN, W.H.R. and
WEINBREN, B.M.

An Epizootic of Nairobi Sheep Disease in Uganda.

J. Comp. Path., 68, 174

1958

WEINBREN, M.P.

Virus-Neutralizing Antibodies in Human Sera from East Africa.

Annu. Rep. East African Virus Res.
Inst. 1958/59, 9, 12

1959a

WEINBREN, M.P.

Nairobi Sheep Disease Vaccine
Annu. Rep. East. Africa Virus Res.
Inst. 1958/59, 9, 16

1959b

8. Lebenslauf

Am 25.4.1951 wurde ich in Schwaig bei Nürnberg als Tochter des Dr. Ing. Heinrich Munderloh und seiner Ehefrau Käthe, geb. Washausen, geboren. Nach einer vier-jährigen Grundschulzeit (von 1958 - 1962) in Mannheim besuchte ich acht Jahre lang ein musisches Gymnasium der gleichen Stadt.

Das Abitur legte ich im Juni 1970 erfolgreich ab.

Am 15. Oktober des gleichen Jahres begann ich das Studium der Tiermedizin in München, das ich dort im November 1975 mit dem Staatsexamen abschloß. Meine Bestallung als Tierarzt erhielt ich am 23. Dezember 1975.

Seit Januar 1976 arbeite ich als Doktorandin am Institut für vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Universität München.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Boch bedanke ich mich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes.

Für die Übergabe des Themas, die wissenschaftliche Beratung und die freundliche Hilfsbereitschaft bei der Fertigstellung meiner Arbeit bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. E. Munz.

Für die stets bereitwillige Hilfe bei allen Arbeitsproblemen bedanke ich mich besonders auch bei Herrn M. Reimann und Fräulein U. von Seyerl.

